

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELA GASPARDO FOLQUITTO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA, ANÁLISE MORFOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Lobelia exaltata* Pohl (CAMPANULACEAE).

CURITIBA
2014

DANIELA GASPARDO FOLQUITTO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA, ANÁLISE MORFOLÓGICA E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Lobelia exaltata* Pohl (CAMPANULACEAE).

Dissertação apresentada como requisito parcial a
obtenção de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no
curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal
do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosi Zanoni Silva

CURITIBA
2014

- F669 Folquitto, Daniela Gaspardo
Investigação fitoquímica, análise morfológica e atividades biológicas de *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae) / Daniela Gaspardo Folquitto. Curitiba, 2014.
128f.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel.
Co-orientadora: Profa. Dra. Rosi Zanoni Silva
1. *Lobelia*. 2. *Lobelia exaltata*. 3. Morfoanatomia. 4. Fitoquímica.
5. Atividades biológicas. I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Silva, Rosi Zanoni.
III. Universidade Federal do Paraná. Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
IV. T.

CDD: 615.321

Dedico esse trabalho a meu querido marido, Ivan, pelo apoio, compreensão e incentivo, a minha filha Gabriela pela ajuda nas pesquisas e em casa, a minha pequena Heloísa por entender as minhas ausências e finalmente aos meus pais, Milton e Clara, que se empenharam muito para a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pela orientação, confiança, amizade e por compartilhar seus conhecimentos sempre com muita disposição.

À Prof^a. Dra. Rosi Zanoni Silva pela orientação, amizade, compreensão e principalmente pelo incentivo em iniciar o mestrado.

À Prof^a. Dra. Marilis Dallarmi Miguel pelo apoio e sinceridade.

À Prof^a. Dra. Jane Manfron Budel por sua amizade, disposição e contribuição com os conhecimentos morfoanatômicos.

Ao Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher e ao biólogo Osmar dos Santos Ribas pela identificação botânica

À Prof.^a Dra. Barbara Fiorin, do Departamento de Química da UEPG, pela contribuição nas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio Esmerino e ao técnico Maurício do Departamento de Análise Clínicas e Toxicológicas pelo auxílio nos experimentos da atividade antimicrobiana.

À Luciane Mendes técnica do laboratório de Farmacognosia pela amizade e ajuda diária.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Lobelia exaltata Pohl (Campanulaceae) é uma herbácea ereta, que ocorre no sul do Brasil, conhecida popularmente como lobelia e arrebenta cavalos. É utilizada na medicina popular para tratar problemas cardíacos. Seu odor lembra levemente o do fumo e geralmente é encontrada em lugares úmidos e brejosos. *Lobelia exaltata* Pohl. apresenta um grande potencial biológico e ainda não existem estudos que descrevam suas propriedades biológicas. Desta maneira, o presente estudo teve por objetivos investigar a composição química desta espécie vegetal, verificar suas atividades biológicas e analisar suas características morfológicas. O material botânico foi coletado em Ponta Grossa, PR, em março de 2013, identificado por taxonomista e processado de acordo com métodos padrões de microscopia ótica e eletrônica e análises fitoquímicas. O material seco foi fracionado por aparelho de Soxhlet, purificado por cromatografia em coluna e as subfrações identificadas espectroscopicamente por RMN uni e bidimensionais. Para as atividades biológicas foram verificados: ensaios *in vitro* de toxicidade preliminar frente *Artemia salina*; atividade antioxidante, pelos métodos de redução do radical DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e determinação da taxa de peroxidação lipídica e ainda a atividade antimicrobiana. *Lobelia exaltata* apresentou folhas sésseis, penínérveas e lanceoladas, com ápice acuminado, base atenuada e margem dentada. A lâmina foliar possui uma cutícula delgada e estriada, estômatos anisocíticos e mesófilo dorsiventral. Foram encontrados laticíferos associados ao floema em folhas e caules. Na fração hexânica foram identificados os fitoesteróis estigmasterol, sitosterol, campesterol e o alceno, *n*-tetracosano; na fração acetato de etila foram isolados o triterpeno, ácido ursólico e a mistura de ácido ursólico e ácido oleanoico. As amostras apresentaram baixa atividade antioxidante em todas as metodologias testadas e ausência de toxicidade sobre a *Artemia salina*. A atividade antimicrobiana foi moderada para o extrato bruto, a fração hexano e acetato de etila (entre 100-500 µg/mL) contra *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*; A mistura de esteroides apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* e moderada para *E. coli*. O ácido ursólico atividade moderada para *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. O tetracosano foi inativo para todas as amostras.

Palavras-chave: *Lobelia*, *Lobelia exaltata*, morfoanatomia, fitoquímica, atividades biológicas.

ABSTRACT

Lobelia exaltata Pohl., popularly known as “lobelia” and “arrebenta-cavalos,” is used in traditional medicine to treat heart problems. It is a native species in the states of Minas Gerais, São Paulo, Paraná, and Santa Catarina. It possesses an herbaceous, erect, fistulous stem, and it procures an abundant flow of latex when its stems, flowers, and leaves are broken. Has great potential for chemical and pharmacological to be in the genus *Lobelia*. Thus, the present study aimed to investigate the chemical composition of this plant, verify their possible biological activities, and investigated their characteristics of the leaves and stems. The plant material were collected at UEPG, in Ponta Grossa (PR), was processed according to standard methods of light, scanning electron microscopy and extracted and fractionated by Soxhlet, subsequently were purified by column chromatography and identified by one-dimensional and two-dimensional ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Analysis For the biological activities were verified: in vitro assays of preliminary toxicity to *Artemia salina*; antioxidant activity through the methods of the radical reduction (DPPH and phosphomolybdenum) and determining to the rate of lipid peroxidation and antimicrobial activity. *Lobelia exaltata* has leaves which are sessile and lanceolate in form. The foliar blade has a thin and striate cuticle, anisocytic stomata, and dorsiventral mesophyll. Laticifers associated with the phloem are encountered in the leaves and stems. Were identified phytosterols estigmasterol, sitosterol and campesterol, the alkane n-tetracosano and triterpens ursolic acid and ursolic/oleanoic acids mixture. Samples showed low antioxidant activity in all tested methodologies and absence of toxicity on *Artemia salina*. The antimicrobial activity was moderate for the crude extract, hexane fraction and ethyl acetate (between 100-500 ug/ml) against *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecalis*. The steroids mixture showed a good antimicrobial activity against *S. aureus* and moderate to *E. coli*. The ursolic acid showed moderate activity against *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecalis*. The tetracosane was inactive to all samples.

Key words: *Lobelia*, *Lobelia exaltata*, morphoanatomy, phytochemistry, biological activities.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	EXEMPLOS DE FÁRMACOS UTILIZADOS NA CLÍNICA	25
FIGURA 2	CAMPANULACEAE. LOBELIOIDEAE. <i>LOBELIA</i> <i>WELWISTSCHII</i> ENGL. & DIELS	29
FIGURA 3	DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>LOBELIA</i> L. SOBRE O TERRITÓRIO BRASILEIRO	30
FIGURA 4	DISTRIBUIÇÃO DE <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL SOBRE O TERRITÓRIO BRASILEIRO	31
FIGURA 5	DESENHO ESQUEMÁTICO DE <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL. (A) CAULE ERETO COM FOLHAS, (B) NERVAÇÃO DA FOLHA, (C) MARGEM DA FOLHA, (D) INFLORESCÊNCIA, (E) FLOR INTEIRA E BRÁCTEA, (F) COROLA ABERTA, (G) FRUTO, (H) SEMENTE	33
FIGURA 6	(A), (B) <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL EM SEU HABITAT , (HORTO MEDICINAL DA UEPG); (C) FOLHAS JOVENS EM HABITAT NATURAL; (D) - INFLORESCÊNCIA.....	34
FIGURA 7	ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS NÚCLEOS ALCALOÍDICOS...	37
FIGURA 8	BIOSSÍNTESES DOS TERPENOS: (A) IP; (B) DMAPP; (C) IPP40	
FIGURA 9	BIOSSÍNTESE DOS TRITERPENOS - (A) ESQUALENO; (B) 2,3-EPOXIDO-ESQUALENO.....	40
FIGURA 10	ESTRUTURAS MOLECULARES DOS TRITERPENOS: (A) - ÁCIDO OLEANOICO; (B) – ÁCIDO URSÓLICO; (C) – α - AMIRINA; (D) – β -AMIRINA.....	41

FIGURA 11	ESTRUTURA MOLECULAR DO COLESTEROL (A) E SITOSTEROL (B).	42
FIGURA 12	NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES	42
FIGURA 13	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO EM APARELHO DE SOXHLET.....	55
FIGURA 14	ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	57
FIGURA 15	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	69
FIGURA 16	<i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL, CAMPANULACEAE. (A) ASPECTO DOS ÓRGÃOS AÉREOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS. (B). ASPECTO DAS FOLHAS. (C). FACE ADAXIAL DA EPIDERME REVELANDO PAREDE CELULAR COM EPIDERME ANTICLINAL, CUTÍCULA ESTRIADA E ESTÔMATOS. (D) FACE ABAXIAL DA EPIDERME MOSTRANDO PARADE CELULAR COM EPIDERME ANTICLINAL, CUTÍCULA ESTRIADA. (E) INFLORESCÊNCIA.	72
FIGURA 17	<i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL, CAMPANULACEAE CAULE EM SEÇÃO TRANSVERSAL – (A) e (B): EPIDERME EM VISTA FRONTAL (A): FACE ADAXIAL EXIBINDO ESTÔMATOS E CUTÍCULA ESTRIADA; (B): FACE ABAXIAL EXIBINDO ESTÔMATOS E CUTÍCULA ESTRIADA; (C): ORGANIZAÇÃO DA LÂMINA MOSTRANDO MESOFILO DORSIVENTRAL E FEIXE VASCULAR COLATERAL; (D): NERVURA MEDIANA MOSTRANDO CILINDRO VASCULAR MEDULAR; (E): DETALHE DA EPIDERME, CUTÍCULA, COLÊNQUIMA E PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL; (F): CILINDRO VASCULAR MOSTRANDO LATICÍFEROS NO XILEMA E NO FLOEMA; (G): DETALHE DO CILINDRO VASCULAR.....	74

FIGURA 18	CAULE EM SEÇÃO TRANSVERSAL – (A). CAULE MOSTRANDO EPIDERME, CÓRTEX, LATICÍFEROS, FLOEMA E XILEMA (B). CAULE INDICANDO, CÓRTEX, LATICÍFEROS, FLOEMA, XILEMA E MEDULA. (C). DETALHE DO SISTEMA VASCULAR REVELANDO ZONA CAMBIAL, XILEMA E LATICÍFEROS NO FLOEMA. (D) CAULE EM REAÇÃO COM REATIVO DE BOUCHARDAT EXIBINDO LATICÍFEROS. (E). CAULE COM REATIVO DE BOUCHARDAT, INDICANDO FLOEMA E XILEMA.....	76
FIGURA 19	ESTRUTURA QUÍMICA: ESTIGMASTEROL (A) , SITOSTEROL (B) E CAMPESTEROL (C) PRESENTES EM <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL, CAMPANULACEAE	82
FIGURA 20	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) PARA H-II	84
FIGURA 21	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE DEPT 135° - 90° (CDCl_3 , 100 MHz) PARA H-II.....	85
FIGURA 22	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (CDCl_3 , 400 MHz) PARA H-II	85
FIGURA 23	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) PARA H-II	86
FIGURA 24	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HSQC PARA H-II (400 MHz, CDCl_3).	86
FIGURA 25	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE ^1H (400 MHz, CDCl_3) PARA H-II.....	87
FIGURA 26	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz, CDCl_3) PARA H-II	87

FIGURA 27	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹³ C (100 MHz, CDCL ₃) DE HE-II.....	89
FIGURA 28	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ¹ H (400 MHz, CDCL ₃) DE HE-II.....	90
FIGURA 29	- ESTRUTURA QUÍMICA: N-TETRACOSANO PRESENTE EM <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL, CAMPANULACEAE	90
FIGURA 30	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE EM CLAE PARA FAE DE <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL, CAMPANULACEAE	92
FIGURA 31	ESTRUTURA MOLECULAR DO FLAVONOIDE DIOSMIN DE <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL, CAMPANULACEAE	92
FIGURA 32	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II.....	95
FIGURA 33	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II.....	96
FIGURA 34	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II.....	97
FIGURA 35	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE DEPT 135°-90° (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II.....	97
FIGURA 36	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H x ¹ H - COSY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II.....	98
FIGURA 37	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE HMBC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II	98
FIGURA 38	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE HSQC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A-II.....	98
FIGURA 39	ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO URSÓLICO.....	99

FIGURA 40	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) PARA A-I.....	102
FIGURA 41	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) PARA A-I.	103
FIGURA 42	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) PARA A-I.....	103
FIGURA 43	ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO URSÓLICO (A) E ÁCIDO OLEANOICO (B)	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE FH-1.....	58
TABELA 2	SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO PARA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE FH-2.....	59
TABELA 3	SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO NA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS DE FAE.....	61
TABELA 4	DADOS DE ANÁLISE EM CLAE PARA FAE	62
TABELA 5	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL	78
TABELA 6	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO...	79
TABELA 7	ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO	79
TABELA 8	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM RELAÇÃO AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO AQUOSO	80
TABELA 9	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^{13}C CORRESPONDENTE AO ESTIGMASTEROL, SITOSTEROL E CAMPESTEROL PRESENTES EM <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL	83
TABELA 10	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA HE-II	110
TABELA 11	DESLOCAMENTO QUÍMICO PARA ^{13}C (400 MHz EM DMSO d_6) CORRESPONDENTE AO ÁCIDO URSÓLICO PRESENTES EM <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL CAMPANULACEAE	94

TABELA 12	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ¹³ C PARA O ÁCIDO URSÓLICO E OLEANOICO.....	100
TABELA 13	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO	105
TABELA 14	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>LOBELIA EXALTATA</i> POHL CAMPANULACEAE.	113
TABELA 15	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE <i>ARTEMIA SALINA</i> ..	115

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA EM RELAÇÃO AO PADRÃO VITAMINA C E RUTINA. EB: EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO; FH: FRAÇÃO HEXANO; FDCM: FRAÇÃO DICLOROMETANO; FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E FOH: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA.	106
GRÁFICO 2 CURVA DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH...	107
GRÁFICO 3 CURVA DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DPPH..	107
GRÁFICO 4 CURVA DO EXTRATO BRUTO PELA REDUÇÃO DO DPPH..	108
GRÁFICO 5 CURVA DA FRAÇÃO HEXANO PELA REDUÇÃO DO DPPH .	108
GRÁFICO 6 CURVA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO PELA REDUÇÃO DO DPPH	108
GRÁFICO 7 CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PELA REDUÇÃO DO DPPH	109
GRÁFICO 8 CURVA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA PELA REDUÇÃO DO DPPH	109
GRÁFICO 9 IC ₅₀ :CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA QUE REDUZ 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH. (EB: EXTRATO BRUTO; FHEX: FRAÇÃO HEXANO; FDCM: FRAÇÃO DICLOMETANO; FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; FEOH: FRAÇÃO ETANÓLICA ...)	110
GRÁFICO10 INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (BHT: HIDROXIBUTILTOLUENO; EB: EXTRATO BRUTO; FHEX:	

FRAÇÃO HEXANO; FDCM: FRAÇÃO DICLOROMETANO; FAE:
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; FEOH: FRAÇÃO
HIDROALCOÓLICA)..... 111

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3 FORMAÇÃO DA LOBELINA 39

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>LOBELIA EXALTATA</i>	
	POHL, CAMPANULACEAE	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A -	Absorbância
AAR% -	Atividade Antioxidante Relativa
ATCC -	American Type Culture Collection
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COZY	Homonuclear COrrrelation Spectroscopy
DPPH -	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HSQC -	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMQC -	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
pH -	Potencial Hidrogeniônico
RMN ¹ H -	Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio
RMN ¹³ C -	Ressonância Nuclear Magnética de Carbono
R _f	Índice de retenção
<i>d</i> -	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
δ	Deslocamento químico
UV -	Ultra Violeta
°C -	Graus Celsius
°GL -	Graus Gay-Lussac
M -	Molar
cm	centímetro
kg	kilograma
h	hora
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
nm -	nanômetro
p/v -	peso por volume
DL50 -	Dose letal média
IC50 -	Concentração inibitória média
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVO	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1	FAMÍLIA CAMPANULACEAE.....	28
3.1.1	Aspectos Botânicos	28
3.2	GÊNERO <i>Lobelia</i> L.....	29
3.3	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Lobelia exaltata</i> Pohl.....	31
3.4	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E QUÍMICOS.....	33
3.4.1	Alcaloides	36
3.4.1.1	Alcaloides piperidínicos	36
3.4.2	Terpenos	39
3.4.2.1	Triterpenos	40
3.4.2.2	Fitoesteróis	41
3.4.3	Flavonoides	42
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	MATERIAL VEGETAL	44
4.1.1	Coleta, Identificação e exsiccata	44
4.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	44
4.2.1	Lâminas semipermanentes.....	44
4.2.2	Pesquisa histoquímica de alcaloide.....	45
4.2.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	45
4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	45

4.3.1	Umidade	46
4.3.2	Cinzas totais	46
4.3.3	Densidade Relativa.....	46
4.4	ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA	47
4.4.1	Extrato Hidroalcoólico e fracionamento de <i>Lobelia exaltata</i> Pohl	47
4.4.1.1	Pesquisa de Alcaloides.....	48
4.4.1.2	Pesquisa de Leucoantocianidinas	48
4.4.1.3	Pesquisa de Heterosídeo Flavônico	49
4.4.1.4	Pesquisa de Flavonóis.....	49
4.4.1.5	Pesquisa de Cumarinas.....	49
4.4.1.6	Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos	50
4.4.1.7	Pesquisa de Esteróis e Triterpenos.....	50
4.4.2	Preparo do Extrato Aquoso	51
4.4.2.1	Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos	51
4.4.2.2	Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos.....	52
4.4.2.3	Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos	52
4.4.2.4	Pesquisa de Taninos	53
4.4.2.5	Pesquisa de Ácidos Voláteis	53
4.4.2.6	Pesquisa de Ácidos Fixos.....	53
4.4.2.7	Pesquisa de Amino Grupo.....	54
4.5	PESQUISA FITOQUÍMICA DE <i>Lobelia exaltata</i> Pohl.....	54
4.5.1	Obtenção do Extrato Bruto	54
4.5.2	Fracionamento do Extrato Bruto.....	56
4.6	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	56
4.6.1	Fração hexano.....	57
4.6.1.1	Fração hexano FH-1.....	58
4.6.1.2	Fração hexano FH-2.....	58

4.6.2	Fração Diclorometano	59
4.6.3	Fração acetato de etila	60
4.7	ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	62
4.7.1	Atividade Antioxidante	62
4.7.1.1	Formação do Complexo Fosfomolibdênico	62
4.7.1.2	Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	63
4.7.1.3	Teste com Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	64
4.7.2	Avaliação da Toxicidade Frente <i>Artemia salina</i>	65
4.7.2.1	Preparo da Solução Salina	65
4.7.2.2	Preparo da Amostra	65
4.7.2.3	Eclosão dos Ovos	66
4.7.2.4	Avaliação da Toxicidade	66
4.7.3	Avaliação da Atividade Antimicrobiana	66
4.7.3.1	Concentração Inibitória Mínima	67
4.7.3.2	Preparo do Inóculo	67
4.7.3.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	68
5	FLUXOGRAMA	69
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1	MATERIAL VEGETAL E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA	70
6.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	70
6.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	77
6.4	ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA	78
6.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Lobelia exaltata</i> Pohl	80
6.6	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	81
6.6.1	Mistura H-II	81
6.6.2	Composto HE-II	88

6.6.3	Fração Diclorometano	91
6.6.4	Fração acetato de etila (FAE)	91
6.6.4.1	Composto A-II.....	93
6.6.4.2	Mistura A-I	99
6.7	ANÁLISES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	104
6.7.1	Atividade Antioxidante	104
6.7.1.1	Formação do Complexo Fosfomoibdênico	105
6.7.1.2	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	106
6.7.1.3	Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico	110
6.7.2	Atividade Antimicrobiana	112
6.7.2.1	Concentração Inibitória Mínima	112
6.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	114
6.8.1	Avaliação da Toxicidade Frente ao Microcrustáceo <i>Artemia salina</i> ...	114
7	CONCLUSÃO.....	116
	REFERÊNCIAS.....	118

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento, cura e prevenção de doenças ao longo dos anos. Inicialmente utilizadas pelos egípcios, se espalharam para outras regiões do mundo e têm contribuído muito para o desenvolvimento da terapêutica moderna. A papoula (*Papaver somniferum* L.), maconha (*Cannabis sativa* L.), babosa (*Aloe vera* L. ex Webb) já tinham sido usadas há milhares de anos antes de Cristo. Estima-se que 25% dos medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas (CALIXTO, 2000; VEIGAS Jr., 2006; CALIXTO, 2008; KUNLE, 2012).

A partir do século XIX ocorreram novas descobertas de substâncias ativas, com atividade biológica confirmando o uso popular das plantas medicinais (MIGUEL e MIGUEL, 2004; CALIXTO 2008).

Segundo Lorenzi e Matos (2002), dentre as milhares de espécies vegetais, pelo menos metade delas pode ter alguma propriedade terapêutica, mas menos de 1% dessas espécies foi estudada adequadamente.

Dados da literatura demonstram que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso, ou seja, as observações populares contribuem amplamente para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais (YUNES e CHECHINEL, 2001; MACIEL *et al.*, 2002).

Tratamento a base de plantas medicinais continuam a ter papel essencial no cuidado à saúde, sendo estimado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que aproximadamente 80% dos habitantes do mundo confiam na medicina tradicional para o cuidado primário da saúde (KUNLE, 2012; YUNES e CECHINEL, 2012).

O Brasil apresenta uma enorme biodiversidade, detendo em seu território entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta com a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies, bem como alguns dos ecossistemas mais ricos em número de espécies vegetais - a Amazônia, a Floresta Atlântica e o Cerrado. A Floresta Amazônica brasileira, com mais de 30 mil espécies vegetais, compreende cerca de 26% das florestas tropicais

remanescentes no planeta (BRASIL, 2012). Toda essa biodiversidade oferece um potencial incomparável de descobertas de novas substâncias a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003; BARREIRO e BOLZANI, 2009; YUNES e CECHINEL, 2012).

Muitas vezes os constituintes químicos das plantas não são conhecidos e o desenvolvimento de um fitoterápico e a elucidação de suas atividades biológicas incluem várias etapas envolvendo um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, microbiologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica (BRESOLIN e FILHO, 2003; TOLEDO *et al.*, 2003).

Quanto às características químicas da planta, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos: os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos entre outros. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, relacionados aos processos adaptativos e geralmente com efeitos biológicos, que são biossintetizados a partir de metabólitos primários, e apresentam distribuição restrita a certas plantas e microrganismo (às vezes característico de um dado gênero ou espécie). São caracterizados por uma enorme diversidade química, como por exemplo, os alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, lignoides entre outros (VERPOORTE, 2000; SIMÕES 2004).

Alguns destes compostos desenvolvem importantes funções na planta, tais como: defesas contra plantas parasitas, vírus, bactérias, fungos e insetos. Os metabólitos secundários das plantas podem também facilitar a interação animal-planta produzindo pigmentos ou substâncias voláteis, cuja função é atrair os polinizadores (DEWICK, 2002; YUNES e CECHINEL 2012).

Os metabólitos secundários são importantes para o homem, por apresentarem propriedades farmacológicas sendo utilizados como matérias-primas para a produção de medicamentos contemporâneos e ainda serem utilizados como aromatizantes, conservantes, corantes, entre outros. Em qualquer caso, o conhecimento da estrutura da substância é fundamental. Por isso a identificação ou determinação estrutural das substâncias presentes em uma dada

espécie é sempre a primeira etapa em qualquer estudo dentro da química de produtos naturais. (HARBONE, 1982; BARREIRO e BOLZANI, 2009).

O estudo das plantas, de acordo com seu uso na medicina popular, tem contribuído ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos (FIGURA 1), até hoje utilizados na clínica como, por exemplo, os alcaloides: morfina (1), emetina (2), colchicina (3), vincristina (4), taxol (5); o flavonoide: rutina (6); etc. (YUNES e CHECHINEL, 2012).

De acordo com Veiga Jr. *et al.* (2005), as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Embora os estudos em fitoquímica, tenham crescido ao longo dos anos, ele ainda é pequeno frente à abundante fonte medicinal natural que compõe a flora brasileira. Existe, portanto extrema importância em realizar pesquisas científicas voltadas à validação de espécies vegetais da flora brasileira, visando o conhecimento de sua composição química e potencial biológico para o desenvolvimento de medicamentos para tratamentos de muitas patologias com pouco recurso terapêutico.

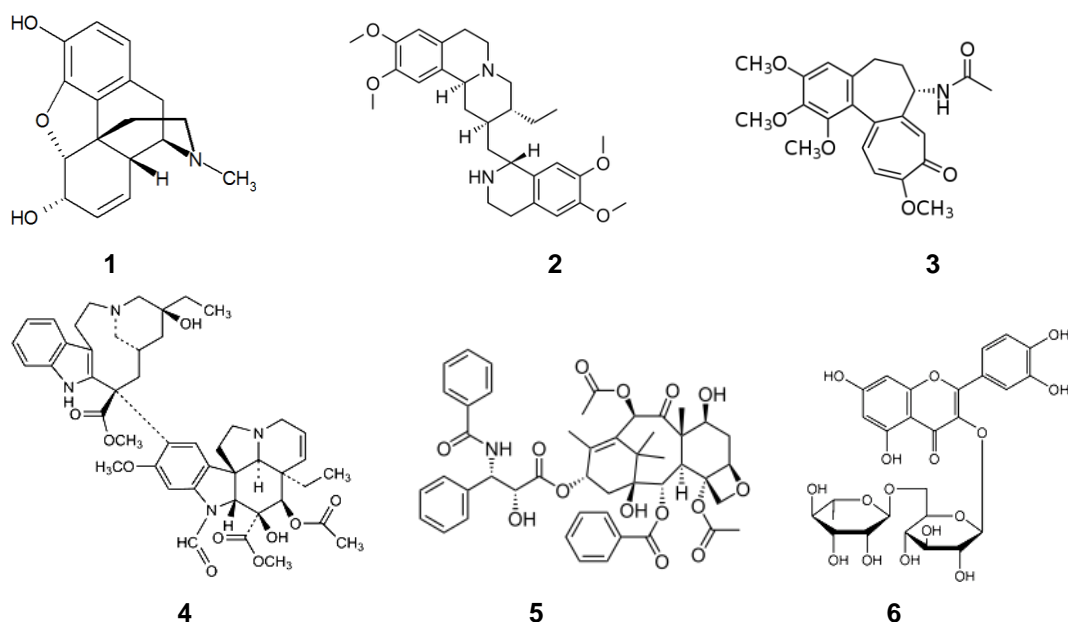


FIGURA 1. EXEMPLOS DE FÁRMACOS UTILIZADOS NA CLÍNICA

Nota: morfina (1), emetina (2), colchicina (3), vincristina (4), taxol (5); o flavonoide: rutina (6)

Neste contexto destaca-se o gênero *Lobelia* L., que possui espécies nativas em nossa região e se desenvolvem abundantemente em lugares brejosos, normalmente não utilizados pela agricultura. Estudos de várias espécies desse gênero comprovam a presença de alcaloides que possuem propriedades broncodilatadoras, anti-inflamatórias, antiasmáticas, antitumorais, analgésicas conhecidas (FELPIN e LEBETRON, 2004; CORRÊA e COSTA, 2008; MA e WINK, 2008). Poucos estudos relacionados com *Lobelia exaltata* Pohl foram realizados até o momento e considerando a possibilidade de descoberta de novas terapêuticas, a realização de um estudo fitoquímico, morfoanatômico e de atividades biológicas da espécie justificam a realização da pesquisa.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo investigar a composição fitoquímica, o potencial biológico e as características morfoanatômicas da espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a composição do extrato bruto e frações de *Lobelia exaltata*;
- Isolar, purificar e identificar substâncias químicas por cromatografia em coluna (CC) e técnicas espectroscópicas;
- Realizar testes de toxicidade do extrato bruto e frações de *Lobelia exaltata* Pohl frente ao microcústáceo *Artemia salina*;
- Realizar testes de atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *Lobelia exaltata* por concentração inibitória mínima (CIM);
- Verificar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Lobelia exaltata* pela redução do complexo fosfomolibdênio, redução do radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e pelo teste de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Descrever características morfoanatômicas de folhas e caules de *Lobelia exaltata* Pohl;
- Realizar pesquisa histoquímica de folhas e caules de *Lobelia exaltata* Pohl.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FAMÍLIA CAMPANULACEAE

3.1.1 Aspectos Botânicos

A família Campanulaceae Jussieu é um grupo de plantas de distribuição cosmopolita presente em grande variedade de habitats e compreendem 84 gêneros e cerca de 2400 espécies (ANTONELLI, 2008).

Vieira (1988) e Lammers (2007) referem que a família é dividida em cinco subfamílias: Campanuloideae Burnett, Lobelioideae Burnett, Lammers Nemacladoideae, Cyphioideae Walp (A. DC.) e Cyphocarpoideae Miers. Destas a Lobelioideae é a maior subfamília e compreende 29 gêneros e cerca de 1200 espécies, das quais metade são nativas da América do Sul.

Espécies da família Campanulaceae geralmente crescem na forma de plantas herbáceas perenes, subarbustos, arbustos, arvoretas ou árvores terrestres, aquáticas ou raramente epífitas, com látex leitoso; caules podem ser simples ou ramificados; ocorre a presença de sistema lactífero bem desenvolvido que produzem um látex viscoso, abundante e geralmente branco; estames presos em discos no ápice do ovário; folhas alternas, simples e com estípulas; cálices sinsépalos formando um hipanto e flores com cinco lóbulos, simpétalas; sementes pequenas e numerosas (CRONQUIST, 1981; LAMERS, 2007; ANTONELLI, 2008). Apresenta formas de vida variadas sendo destaque a paquicaulia, desenvolvimento de caules eretos em plantas herbáceas, resultando em ervas até 4 m de altura, características de algumas espécies da subfamília *Lobelioideae* (GODOY, 2003).

No Brasil a distribuição geográfica das Campanulaceas ocorre da seguinte forma: Norte (Roraima, Pará, Amazonas, Acre, Rondônia), Nordeste (Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do

Sul) e a subfamília *Lobelioideae* está dividida em 6 gêneros, 56 espécies, 2 subespécies e 1 variedade. Os gêneros são *Centropogon* C. Presl, *Hippobroma* G. Don, *Lobelia* L., *Siphocampylus* Pohl, *Triodanis*, *Wahlenbergia* W. Roth (VIEIRA, 2010).

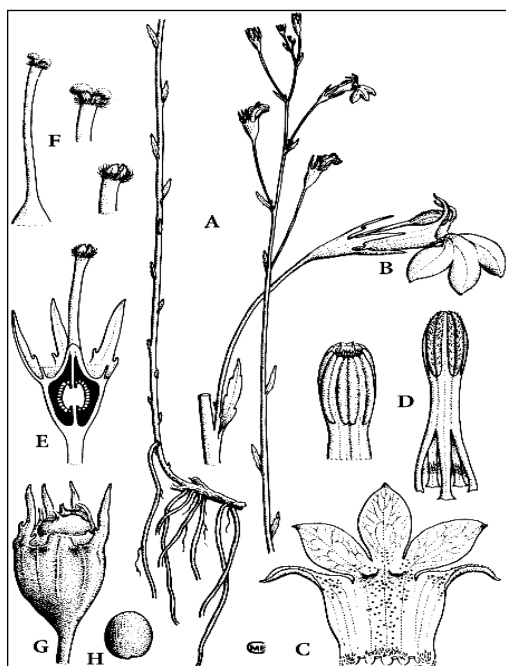


FIGURA 2. Campanulaceae-Lobelioideae. *Lobelia welwitschii*. **A** HABITAT. **B** FLOR. **C** COROLA ABERTA. **D** ESTAME E TUBO DE ANTERA. **E** SECÇÃO LONGITUDINAL DE OVÁRIO. **F** ESTIGMA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO. **G** CAPSULA. **H** SEMENTE. FONTE: LAMERS (2007)

3.2 GÊNERO *Lobelia* L.

O gênero *Lobelia* L. foi criado por PLUMIER em homenagem a Mathias de L'Obel um botânico de Lille e 1538 e foi finalmente estabelecido em 1873 com a descrição de Linnaeus na obra *Species Plantarum*. Abriga centenas de espécies espalhadas por todo o globo, distribuídas em zonas tropicais e subtropicais, em lugares úmidos ou paludosos, em altitude variando de 0 a 4.000 metros. A América é considerada a região do mundo onde se encontra o maior número de espécies de *Lobelia*, sendo 388 consideradas válidas por Wimmer (BORIO, 1959;

VIEIRA, 1988; LAMMERS, 2011). Lammers (2011) considera atualmente 415 espécies para o gênero *Lobelia* L.

No Brasil o gênero é composto de 21 espécies e está distribuído nas regiões Norte (Roraima, Pará, Amazonas, Acre), Nordeste (Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (VIEIRA, 2012).

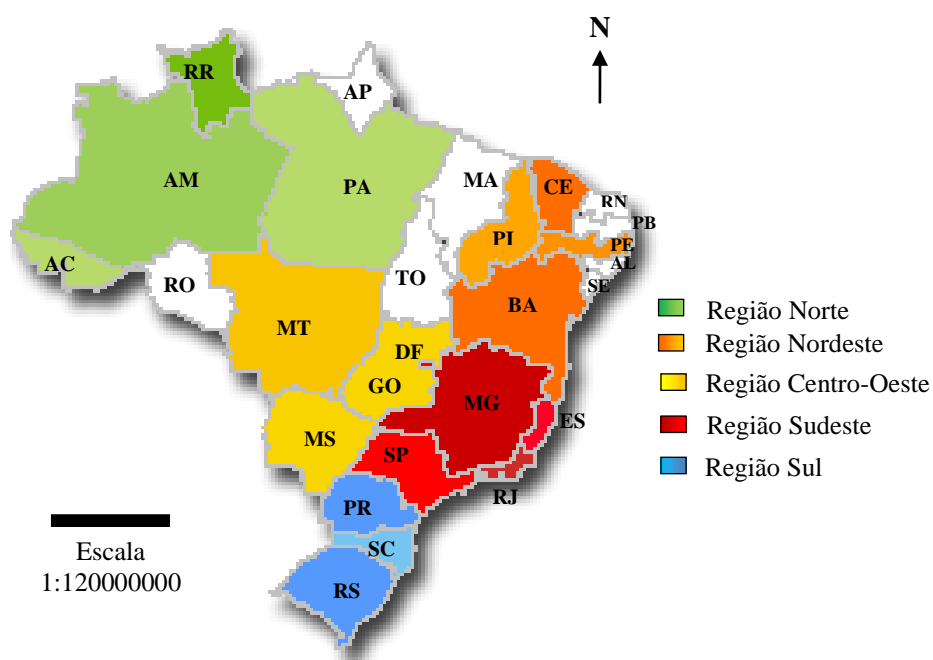


FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Lobelia* L. SOBRE O TERRITÓRIO BRASILEIRO.

FONTE: VIEIRA (2012).

Nota: Estados em branco não apresentam plantas do gênero *Lobelia* L. no Brasil.

As plantas do gênero *Lobelia* L. são herbáceas, robustas e não ramificadas acima do nível do solo, com caules frequentemente fistulosos. São encontradas floridas a partir de 1 metro de altura e como a inflorescência é indeterminada, seu comprimento contribui para o comprimento total. A base do caule apresenta numerosas raízes adventícias que serviria para dar apoio à planta que frequentemente pode ser encontrada em lugares brejosos. As folhas podem ser simples, alternas, sem estípulas e diminuem o seu tamanho na direção do ápice. Ocorre a presença de tricomas nas estruturas florais. As inflorescências são racemosas, carregadas em um cacho terminal, onde são encontrados concomitantemente botões florais, flores e frutos. A partir da base dos racemos

podem ocorrer ramificações como inflorescências secundárias sempre menores que a principal. As sementes são ovóides e comumente aladas (VIEIRA, 1988; LAMMERS, 2011).

Vieira (1988) relata que no caso da *Lobelia exaltata* foi observado indivíduos rebrotando na base da planta, o que possibilitaria a formação de novos indivíduos ligados à planta mãe que posteriormente ficariam isolados.

Godoy (1989) realizou o levantamento florístico e quimiosistemático da família Campanulaceae na região da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, analisando a constituição parafínica das ceras foliares de *Lobelia* e *Siphocampylus* ocorrentes na região descrevendo as suas características químicas e relacionando-as ao nicho ecológico ocupado por elas.

3.3 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Lobelia exaltata* Pohl

Lobelia exaltata Pohl (do latim, elevada) no Brasil ocorre nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRAGA, 1956; TRINTA e SANTOS, 1989; TAKEDA, 2001; VIEIRA, 2010). No estado do Paraná, região de Ponta Grossa, pode ser encontrada com muita frequência em banhados e lugares brejosos (FIGURA 4).



FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO DE *Lobelia exaltata* Pohl SOBRE O TERRITÓRIO BRASILEIRO
FONTE: VIEIRA (2012).

O enquadramento taxonômico da espécie *Lobelia exaltata* Pohl está representado no QUADRO 1.

	Segundo Engler (1964)	Segundo Cronquist (1968)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Embryophita Siphonogama	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
Sub-Classe	Sympetalae	Asteridae
Ordem	Campanulales	Campanulales
Família	Campanulaceae	Campanulaceae
Gênero	<i>Lobelia</i>	<i>Lobelia</i>
Espécie	<i>Lobelia exaltata</i> Pohl	<i>Lobelia exaltata</i> Pohl

QUADRO 1 -- ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Lobelia exaltata* Pohl.

A planta fresca (FIGURAS 6A e 6B) apresenta altura entre 1,5 e 3,5 m, abundante escoamento de látex de cor branca na ruptura dos caules, folhas e flores. Seu odor lembra levemente o cheiro de fumo. O caule é ereto com cor verde clara, glabro, estriado e fistuloso. As folhas (FIGURA 6C) são sésseis, membranáceas, alternas, glabras, oblonda ou lanceolada com 14 a 44 cm de comprimento e 1,4 a 5,5 cm de largura, com margem calosa denticulada (FIGURA 5C), com ápice agudo e base subatenuada a nervura principal é proeminente na face inferior com cor arroxeada (FIGURA 6C). Inflorescência terminal (FIGURA 6B e 6D) de 09 a 49 cm de comprimento, com inflorescências secundárias glabras ou hirsutas no eixo. Bráctea linear, hirsuta em ambas as faces com ápice agudo com dente caloso, margem inteira ou denteada com calose e ciliada, base concrecida ao pedicelo. Pedicelo sigmoide ascendente, com ou sem as duas bractéolas, hirsuto. Cálice com ápice agudo, com calose, margem integra hialina e ciliada, pubescente em ambas as faces. Corola (FIGURA 5F), pilosa em ambas as faces, cor variando entre alvas e creme esverdeadas. Ovário, ovoide e hirsuto. Fruto ovoides (FIGURA 5G), com a metade livre, hirsuto ou com pelos esparsos. Semente largo alada (FIGURA 5H). A floração e frutificação ocorre nos meses de dezembro a maio. Desenvolve-se preferencialmente nos banhados ou brejos dos campos nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. (BRAGA, 1956; VIEIRA, 1988, TAKEDA e FARAGO, 2001).

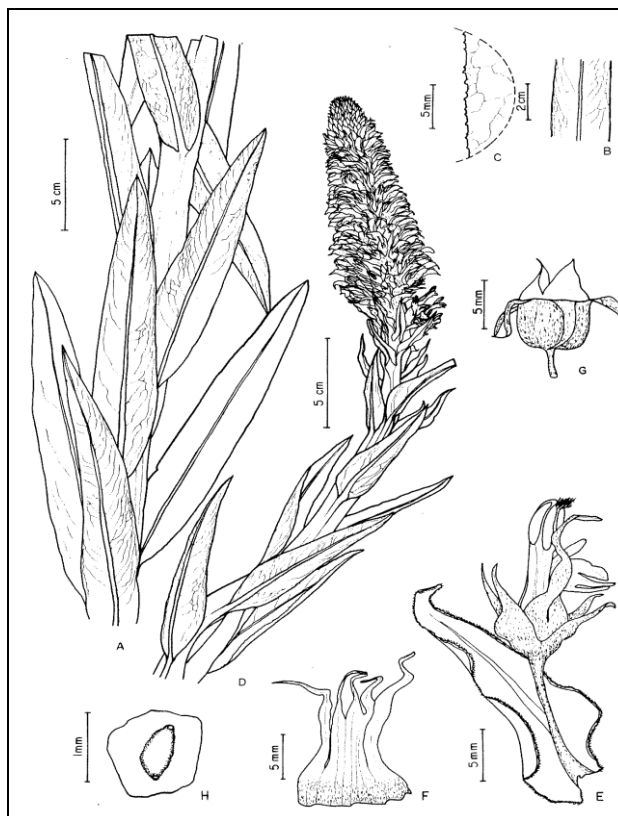


FIGURA 5. DESENHO ESQUEMÁTICO DE *Lobelia exaltata*. (A) CAULE ERETO COM FOLHAS, (B) NERVAÇÃO DA FOLHA, (C) MARGEM DA FOLHA, (D) INFLORESCÊNCIA, (E) FLOR INTEIRA E BRÁCTEA, (F) COROLA ABERTA, (G) FRUTO, (H) SEMENTE. FONTE: VIEIRA (1988).

3.4 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E QUÍMICOS

A família Campanulaceae comumente armazena carboidrato (amido) na forma de inulina. Alcaloides piperidínicos como a lobelina comumente se acumulam no látex de Lobelioideae e parece estar ausente nas outras subfamílias, em Campanuloideae aparentemente os poliesterois tomam o seu lugar. Algumas espécies produzem poliacetilenos que são alifáticos com 14 átomos de carbono; tetrahidropiranos são únicos para a família. Campanulaceae não produzem iridoides nem lactonas sesquiterpênicas. O ácido cafeico é um constituinte fenólico comum em Campanuloideae e mais raro em Lobelioideae, já outros compostos fenólicos como quercetina, campferol, ácido ferúlico, cianidina, antocianidinas aparecem em várias Campanulaceae. O ácido elágico, miricetina e leucoantocianinas estão ausentes na família como um todo.

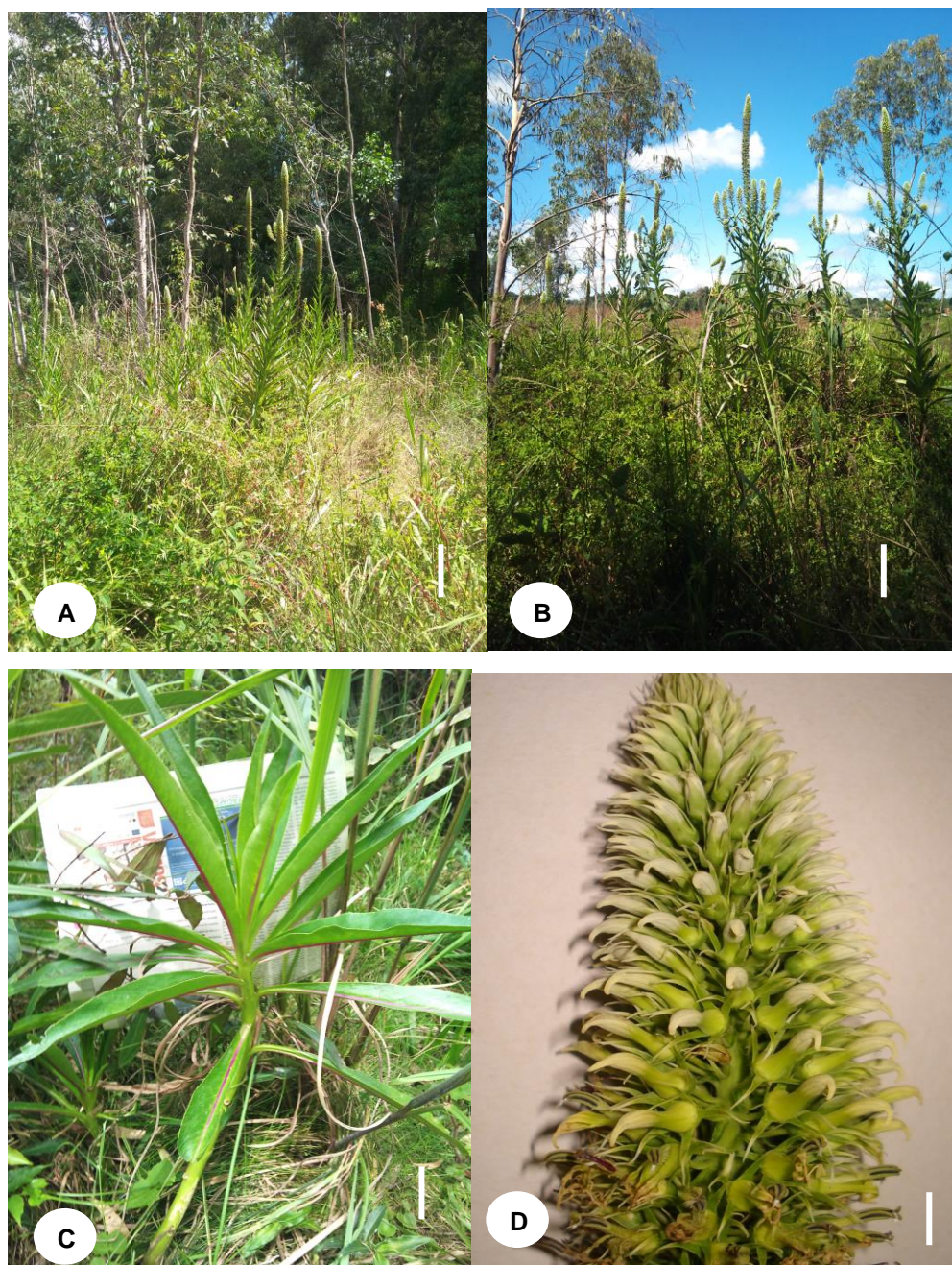


FIGURA 6. (A), (B) *Lobelia exaltata* Pohl EM SEU HABITAT, (HORTO MEDICINAL DA UEPG); (C) FOLHAS JOVENS EM HABITAT NATURAL; (D) INFLORESCÊNCIA de *L. exaltata* Pohl. Bar = 15 cm (A, B), 10 cm (C), 1 cm (D).
FONTE: A AUTORA (2013).

Raramente produzem compostos cianogênicos e saponinas (CRONQUIST, 1981; LAMMERS 2007).

O gênero *Lobelia* L. apresenta diversas espécies espalhadas pelo mundo com propriedades medicinais e tem sido utilizado como modelo para vários estudos químicos e farmacológicos pelo fato de produzirem alcaloides. Este

gênero é reconhecido em várias farmacopeias, devido às suas propriedades de estimulação respiratória e tem sido incorporado em preparações contra asma brônquica e bronquite crônica. O sulfato de lobelina é utilizado como substituto da nicotina no tratamento do tabagismo, e o seu hidrocloreto é administrado intramuscularmente como estimulante respiratório (FARMACOPEIA BRASILEIRA II, 1959; MARTINDALE, 1989).

Lobelia inflata L. é uma espécie americana que recebeu maior atenção dos estudiosos, pois era muito utilizada popularmente na terapêutica na forma de pó, tintura, xarope e infuso por apresentar propriedades emética, hipnótica, antiasmática, adstringente e como substituta do tabaco, ficando conhecida como tabaco indiano. Os estudos das propriedades terapêuticas e isolamento dos princípios ativos iniciaram em 1885 e desencadearam diversas referências de outros estudos, inclusive de espécies brasileiras produtoras de alcaloides, constituindo uma valiosa fonte para a extração destas substâncias (BRAGA, 1956; BORIO, 1959; NAGANDA *et al.*, 2012).

Lobelia syphilitica L. utilizada por indígenas no Canadá como anti-sifilítico. *Lobelia urens* L. da Europa empregada como vermífugo *Lobelia nicotinaefolia* Heyne das Índias Ocidentais, com aplicações semelhantes à espécie *Lobelia inflata*, *Lobelia laxiflora* Humb. usada como emética, expectorante e reguladora da respiração, *Lobelia tupa* L. empregada na oftalmologia, *Lobelia purpurascens* R. Br. útil no tratamento de picadas de cobras (BORIO, 1959).

Hegnauer (1966) reporta que além dos alcaloides outros compostos químicos podem ocorrer em *Lobelia* L. como polifenóis, triterpenos, resinas e ceras.

Magalhães *et al.* (1988) e Magalhães *et al.* (1989) estudaram várias espécies brasileiras de *Lobelia* e demonstraram a ocorrência de poliacetilenos acíclicos C₁₄ contendo cromóforos, relacionando-a com a espécie com a distribuição dos poliacetilenos.

Zhang *et al.* (1990), isolaram cinco alcaloides, dois triterpenos e um sitosterol de *Lobelia davidii* Franch.

Estudos de atividade farmacológica no cérebro de mamíferos demonstraram que o alcaloide lobelina extraído da *Lobelia inflata*, pode inibir os efeitos comportamentais da metanfetamina e também pode ser utilizada na

farmacoterapia por abuso de psicoestimulantes incluindo cessação do tabagismo (HARROD *et al.*, 2004; EYERMAN eYAMAMOTO, 2005).

Ma e Wink (2008) demonstraram o potencial efeito da lobelina em reverter a resistência multidrogas P-gp (P-glicoprotein) dependente em células de tumor, em concentrações não tóxicas.

Joshi *et al.* (2011) analisaram a composição do óleo essencial e a atividade antimicrobiana de *Lobelia pyramidalis* Wall identificando um total de 21 constituintes, sendo o de maior concentração o cetona perilla. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi considerada moderada, provavelmente pela presença dos terpenos.

Baseando-se nos dados obtidos em literatura consultada, verificou-se que os alcaloides estão entre os principais componentes químicos encontrados no gênero *Lobelia* L., além de esteroides, triterpenos e flavonoides (ZANGH, WANG e ZHOU, 1990; FELPIN e LEBRETON, 2004; WANG *et al.*; 2007; TAMBOLI *et al.*, 2012).

3.4.1 Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos encontrados principalmente nas Angiospermas. Têm sido sugeridos vários modos de classificar os alcaloides, sendo que os mais utilizados estão baseados na estrutura do anel ou aminoácido que lhe deu origem. De acordo com estes parâmetros, os alcaloides de *Lobelia* L. são classificados neste trabalho como sendo piperidínicos (SIMÕES, 1999). A FIGURA 7 ilustra a estrutura dos principais núcleos alcaloídicos.

3.4.1.1 Alcaloides Piperidínicos

Alcaloides piperidínicos tem o aminoácido lisina como seu precursor. A lisina é sintetizada pelas plantas superiores envolvendo a descarboxilação do ácido 2,6-diaminopimélico, o qual é formado pela condensação do piruvato com

aspartato. Alcaloides derivados da lisina têm um esqueleto base C_5N (ESQUEMA 1) conhecido como núcleo piperidínico (COSTA, 1977; BIAVATTI, 1994; ANISZEWSKI, 2007; SIMÕES, 2010).

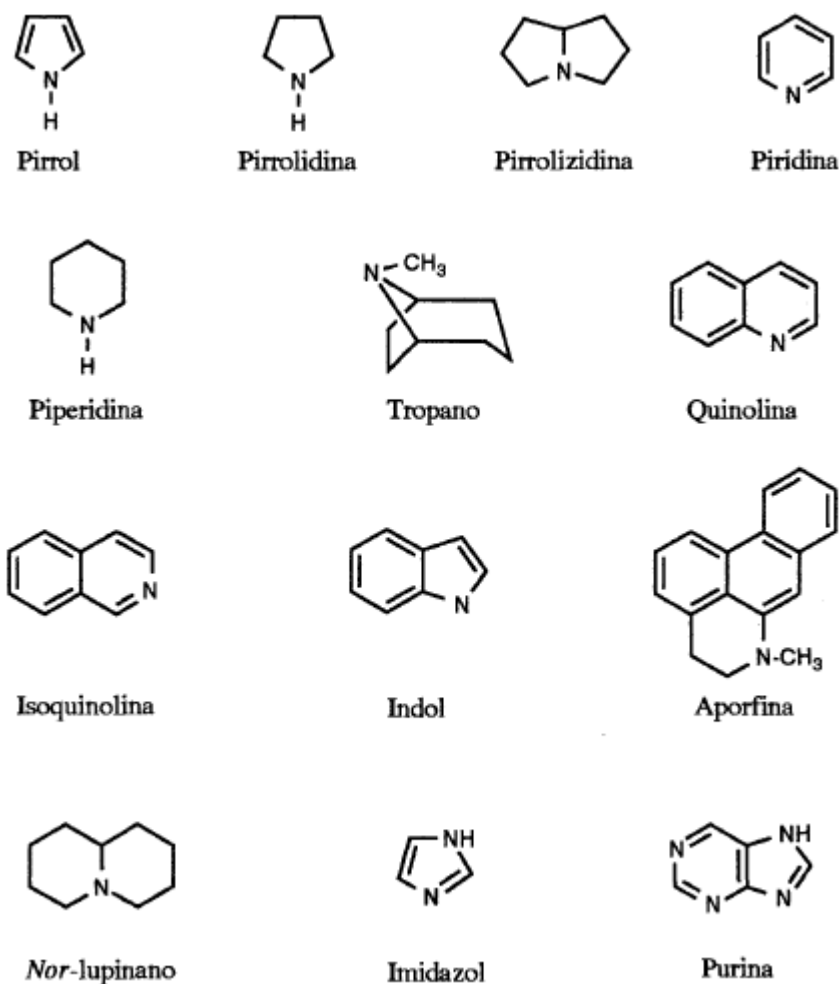


FIGURA 7. ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS NÚCLEOS ALCALOÍDICOS.

FONTE: SIMÕES (2010)

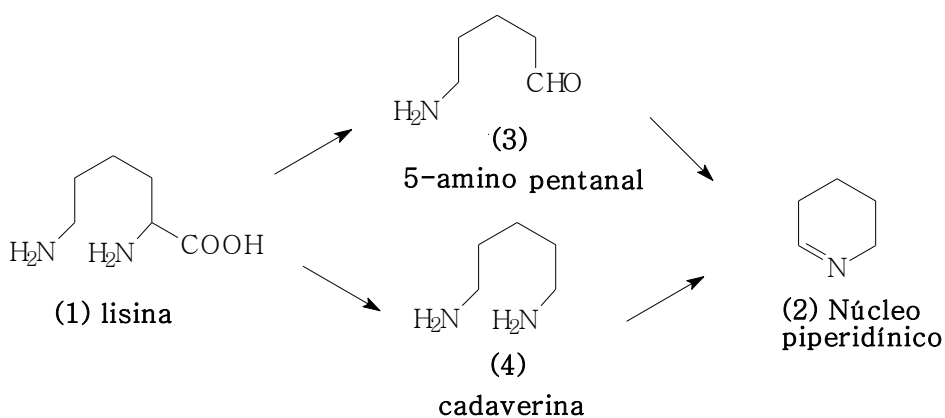
Segundo Felpin e Lebetron (2004), na biossíntese da lobelina duas vias são possíveis, porém controversas (ESQUEMA 2). Na primeira a lisina (1) fornece (2) por meio do 5-aminopentanal (3). Na segunda sugere-se a formação de (2) através da cadaverina (4).

A condensação de (2) com ácido benzoil-acético (5) forneceu a amino cetona (6) onde a oxidação via (7) e reação com outra molécula de (5) resultou na

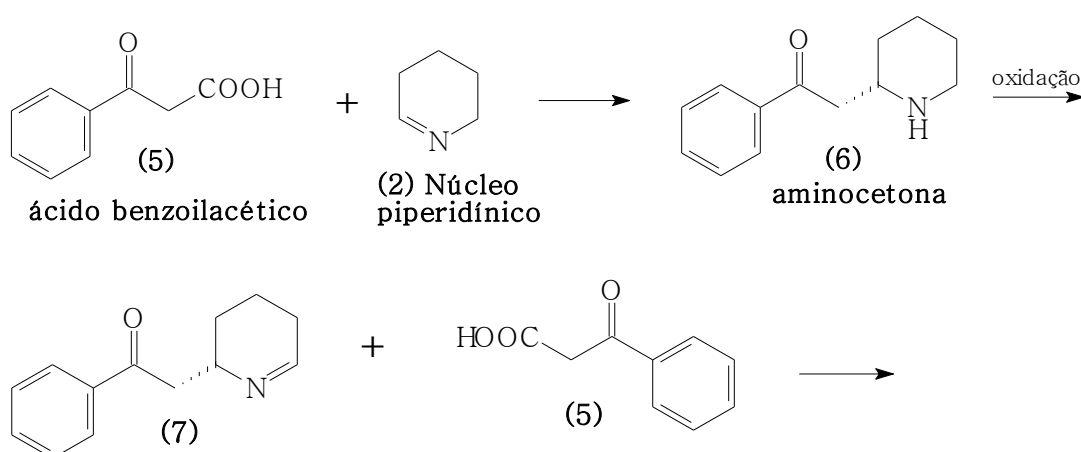
norlobelalina (8). A N metilação de (8) produziu a lobelanina (9). O último passo no processo é a redução de um dos grupos carbonila e formação da lobelina (10) (ESQUEMA 3).

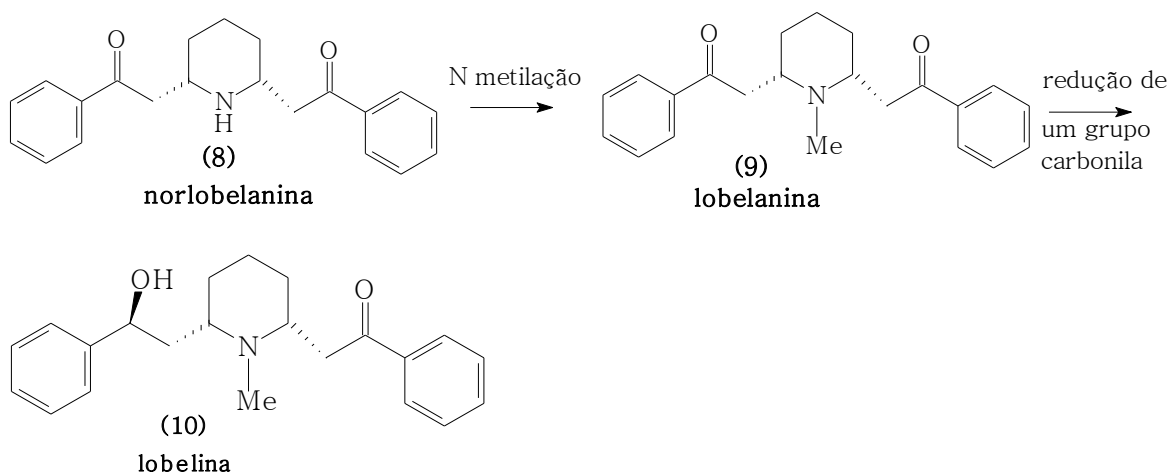


ESQUEMA 1 - LISINA (1) E NÚCLEO PIPERIDÍNICO (2)
FONTE: FELPIN e LEBETRON (2004)



ESQUEMA 2 - POSSIVEL FORMAÇÃO DO NÚCLEO PIPERIDÍNICO NA BIOSSÍNTESE DA LOBELINA
FONTE: FELPIN e LEBETRON (2004)





ESQUEMA 3 - FORMAÇÃO DA LOBELINA

FONTE: FELPIN e LEBETRON (2004)

3.4.2 Terpenos

Os terpenos são uma classe de metabólitos secundários naturais bastante conhecidos e numerosos com cerca de 30.000 substâncias já isoladas. São encontrados em abundância nas plantas superiores e em menor quantidade em fungos e organismos marinhos (VEERPOTE, 2000).

A classificação ocorre de acordo com o número de unidades de isopreno em: hemiterpenoides (C_5); monoterpenoides (C_{10}); sesquiterpenoides (C_{15}); diterpenoides (C_{20}); triterpenoides (C_{30}) e tetraterpenoides (C_{40}). Os terpenos de origem vegetal possuem funções importantes como defesa, repelentes de insetos, agentes de atração de polinizadores, proteção contra herbívoros, feromônios, proteção contra fungos e bactérias, hormônios de crescimento vegetal, além de funcionarem atuarem na germinação de sementes e na inibição do crescimento da raiz (YUNES e CECHINEL FILHO, 2012).

Antes a via biossintética era conhecida como sendo do acetato-mevalonato a partir de unidades de isopreno que se ligam entre si, orientados em sentido inverso (cabeça-cauda). Depois da descoberta da via do não mevalonato, o conceito de biossíntese passou por mudanças. O isopreno (IP) é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos terpenos. As unidades ativas de isopreno são na verdade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (YUNES e CECHINEL FILHO, 2012).

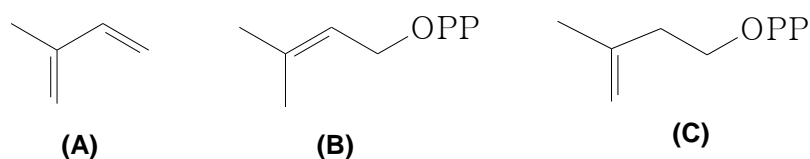


FIGURA 8 – BIOSÍNTESES DOS TERPENOS.: (A) IP; (B) DMAPP; (C) IPP.

A adição de uma unidade de DMAPP (FIGURA 8B) ao C₅ do IPP (FIGURA 8C) forma o precursor geranyl pirofosfato (GPP, C₁₀). A adição de uma unidade de IPP ao GPP, forma sucessivamente o farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅) e o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C₂₀). Os demais terpenos são formados da mesma forma, por adição de uma unidade de IPP aos seus respectivos precursores (VERPOORTE, 2000; YUNES e CECHINEL FILHO, 2012).

3.4.2.1 Triterpenos

Os triterpenos são possivelmente o grupo mais importante dos terpenos, encontram-se na fauna e flora terrestre e marinha e ocorrem na forma livre, de éter, éster e glicosídeo. Resultando de duas moléculas de FPP associando-se cauda-cauda por meio de um processo complexo para formar o 2,3-epóxidoesqualeno. Os triterpenos derivam do esqualeno (FIGURA 9A) e do arranjo epóxido do esqualeno (FIGURA 9B) seguido de uma condensação (MAHATO, 1994; SIMÕES, 2010; YUNES e CECHINEL FILHO, 2012).

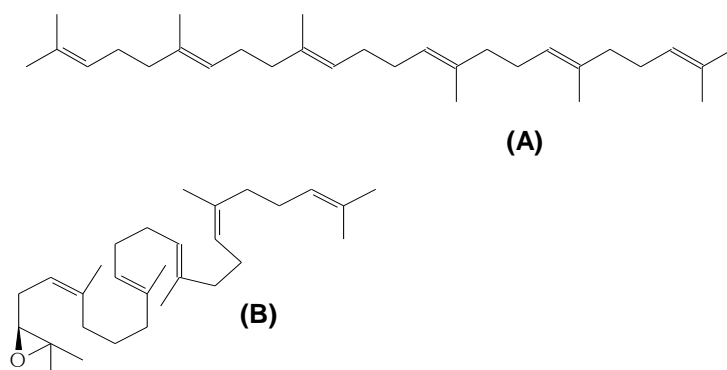


FIGURA 9 BIOSÍNTESE DOS TRITERPENOS - (A) ESQUALENO; (B) 2,3-EPOXIDO-ESQUALENO.

Os triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico (FIGURA 10B) e oleanoico (FIGURA 10A) e α e β -amirina (FIGURA 10C e D), são isômeros da família dos ursanos e oleananos, respectivamente. Geralmente quando se encontram em uma determinada espécie, são isolados como mistura. (YUNES e CECHINEL FILHO, 2012). Sun *et al.* (2012), estudaram os compostos biologicamente ativos de *Lobelia sessilifolia* isolaram e identificaram alguns triterpenos como, ácido ursólico, ácido oleanoico, β -amirina, 3-O- β palmitato, maniladiol 3-O- β palmitato.

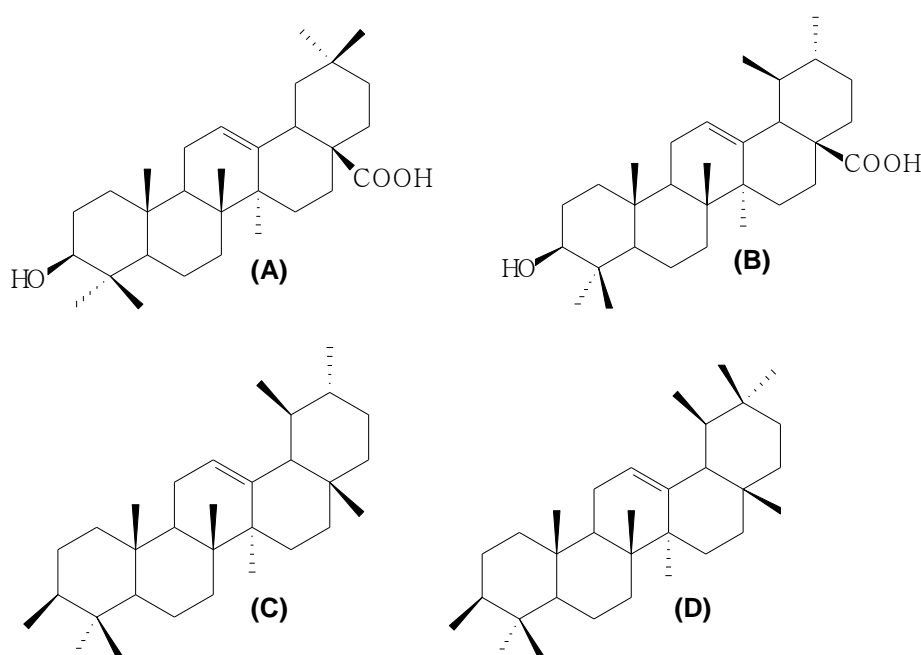


FIGURA 10 - ESTRUTURAS MOLECULARES DOS TRITERPENOS: (A)- ÁCIDO OLEANOICO; (B) – ÁCIDO URSÓLICO; (C) – α -AMIRINA; (D) – β -AMIRINA.

3.4.2.2 Fitoesteróis

Os fitoesteróis ou esteróis vegetais pertencem à família dos triterpenos com um anel tetracíclico e uma cadeia lateral ligada ao carbono 17. Estão relacionadas tanto estruturalmente como biossinteticamente ao colesterol. A diferença estrutural entre o colesterol (FIGURA 11A) e o Sitosterol (FIGURA 11B) consiste da adição de um grupo etil presente na posição C-24 no sitosterol. Mais de 250 fitoesteróis e compostos derivados já foram identificados em várias

espécies vegetais, porém, os mais abundantes são sitosterol, estigmasterol e campesterol, responsáveis por cerca de 98% dos fitoesteróis ingeridos (MOGHADASIAN, 2000; MARANGONI e POLI, 2010).

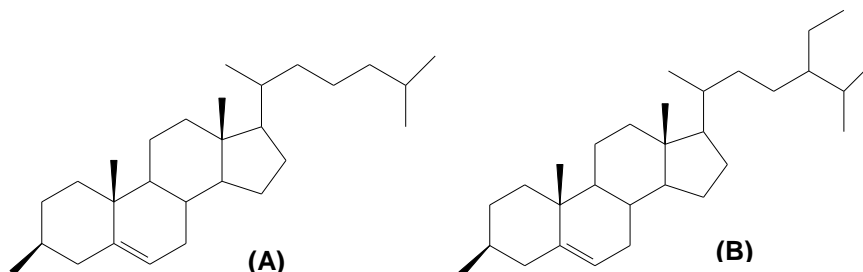


FIGURA 11 - ESTRUTURA MOLECULAR DO COLESTEROL (A) E SITOSTEROL (B).

3.4.3 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma ampla classe de compostos polifenólicos, comum em plantas, que possuem hidroxilas fenólicas ligadas a estruturas de anel, o que confere atividade antioxidante (RICE-EVANS, 1996; SIMÕES, 2010) São compostos de baixo peso molecular com uma estrutura base de 15 carbonos, esqueleto difenilpropano, composta por dois anéis fenólicos (A e B) ligados por um anel pirano (C), como demonstrado na (FIGUA 12). Apresentam atrativos visuais que favorecem a polinização e atuam como um mecanismo de defesa contra insetos e microrganismos e suas propriedades antioxidantes conferem proteção contra a radiação ultravioleta.

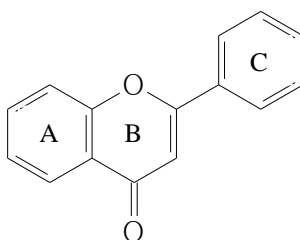


FIGURA 12 - . NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES.

Os flavonoides de origem natural apresentam-se geralmente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (glicosídeos) (SIMÕES, 2010).

São considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos, pois estão amplamente distribuídos, com uma grande variedade estrutural e além de muito estáveis, são facilmente identificados. Apesar de já haver conhecimento de inúmeras atividades biológicas nos últimos anos, como: antialérgica, hepatoprotetora, antitrombica, antiviral, anticarcinogênica, antiproliferativa, antiinflamatória e antioxidante, as três últimas são as mais reconhecidas (SIMÕES, 2010; YUNES e CECHINEL FILHO, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

4.1.1 Coleta, exsicata e identificação

O material acima citado foi coletado em março de 2012, no município de Ponta Grossa (25,15327S e 50,13873W, 835m de altitude), Paraná, Brasil. Posteriormente, foi fragmentado a pequenos pedaços e seco à sombra em temperatura ambiente, durante uma semana para sua completa dessecação.

Uma exsicata foi preparada com o material vegetal florido e enviada ao herbário do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a sua identificação taxonômica. Este material foi analisado e identificado pelo Dr. Nelson Ivo Matzenbacher como sendo *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae, sob registro ICN - Nº 192140.

4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

O estudo morfoanatômico foi realizado com caules jovens obtidos a 5 cm do vértice e folhas adultas de, pelo menos, três espécimes de *L. exaltata*. O material foi fixado em FAA 70 (Formo, Ácido Acético, Álcool), de acordo com Johansen (1940) e após uma semana, estocado em uma solução de etanol a 70% (v/v) (BERLYN e MIKSCHE, 1976).

4.2.1 Lâminas semipermanentes

O material foi seccionado à mão livre e cortes transversais e longitudinais, incluindo-se os paradérmicos foram realizados. A coloração foi feita com uma combinação de azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972). As lâminas semipermanentes foram montadas com glicerina a 50% (v/v) (BERLYN e MIKSCHE, 1976) e a lutagem feita com esmalte incolor (BEÇAK e PAULETE, 1976).

4.2.2 Pesquisa histoquímica de alcaloide

A pesquisa histoquímica para constatar a presença de alcaloides presente no látex foi realizada de acordo com Borio (1959). Os cortes transversais de caule e folha foram realizados com o material recentemente colhido e divididos em duas séries. A primeira foi tratada com reativo de precipitação de alcaloides (Bouchardat) e a segunda foi colocada em frasco com rolha esmerilhada contendo uma solução alcoólica de ácido tartárico a 5% (dissolvente dos alcaloides) durante uma semana e depois tratada com o mesmo reativo a fim de servir de prova em branco para a comparação com as primeiras.

As lâminas foram examinadas e ilustradas com fotos feitas ao microscópio ótico Olympus CX 31 ligado a câmera Olympus C-7070.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise ultraestrutural (microscopia eletrônica de varredura - MEV), amostras fixadas em FAA 70 foram desidratadas em uma série etanólica crescente e preparadas de acordo com microtécnicas para escaneamento de elétrons (SOUZA, 1998) por meio do equipamento Balzers CPD-010 e Sputtering SCD-030. O material foi analisado utilizando o microscópio eletrônico Philips SEM 505.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O material vegetal coletado (16 kg de material fresco) foi submetido à dessecação em temperatura ambiente e o seccionamento foi realizado em moinho de facas.

4.3.1 Umidade

A metodologia escolhida para a determinação da umidade está descrita na Farmacopeia Brasileira IV. A planta pulverizada (5 g) foi acondicionada em 7 cadinhos previamente dessecados e levados à estufa a 100° C por 1 h. Posteriormente foram acondicionados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesados até peso constante tendo os valores anotados para a realização dos cálculos. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação:

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Pu –Peso do cadinho contendo amostra antes da dessecação

Ps –Peso do cadinho contendo amostra depois da dessecação

Pa –Peso da amostra

4.3.2 Cinzas totais

O método utilizado para determinação das cinzas totais e teor de sólidos está presente na Farmacopéia Brasileira IV. A matéria prima vegetal (5g) foi acondicionada em cadinhos previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas em mufla (EDG 3000 10P-S) a 600°C por 30 min. Após essa etapa foram calculadas as porcentagens de cinzas em relação ao material vegetal seco. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

4.3.3 Densidade Relativa

Para o ensaio de determinação da densidade foi utilizado o método da proveta, onde, o pó das partes aéreas da espécie *L. exaltata*, foi transferido para uma proveta de 25 mL, com peso conhecido, até completar o volume de 20 mL. Durante a transferência foram removidas as partículas de ar que estavam presentes entre o pó da planta. Em seguida, a proveta contendo o pó foi pesada, e pela diferença de pesos, foi obtida a quantidade de pó contido na proveta. O valor da densidade foi obtido pelo cálculo do peso do pó dividido pelo volume (20 mL). O ensaio foi realizado em triplicata (MIGUEL, 2003).

4.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

O ensaio sistemático de análise fitoquímica preliminar é importante para identificar os principais grupos do metabolismo secundário da espécie medicinal em estudo, através de reações de coloração ou precipitação. Para realização destes testes foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003), que consta das etapas abaixo descritas. Todos os solventes utilizados apresentavam padrão analítico (PA).

4.4.1 Extrato Hidroalcoólico e Fracionamento de *Lobelia exaltata* Pohl

Para obtenção do extrato hidroalcoólico, 40 g da droga vegetal seca e moída foi submetida à maceração e estabilizada em 200 mL de álcool etílico a 70% v/v, em banho-maria (Nova Ética) a 70°C por 1 h. O macerado foi então filtrado em papel de filtro e completado o volume para 200 mL com etanol a 70%.

O extrato foi concentrado até 30% do seu volume e particionado com solventes de polaridade crescente, em funil de separação obtendo-se a fração hexano (FH), diclorometano (FDCM) e acetato de etila (FAE). Para cada fração

foram utilizados 20 mL do extrato e o volume completado para 200 mL com o próprio solvente. O resíduo do extrato constituiu a fração hidroalcoólica (FEOH), tendo seu volume completado para 200 mL com etanol 70%. As frações foram acondicionadas em frasco âmbar, rotuladas e mantidas sob-refrigeração.

4.4.1.1 Pesquisa de Alcaloides

Os alcaloides são compostos de caráter básico e sua solubilidade nos diferentes solventes varia em função do pH, na forma básica em solvente orgânico e na forma de sal em solventes aquosos.

As técnicas de reconhecimento são baseadas na capacidade que tem os alcaloides na forma de sal (extratos ácidos), de combinar-se com o iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio, tungstênio formando precipitados.

A pesquisa qualitativa foi feita com os reativos gerais de alcaloides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand), iodo-iodeto de potássio (Reativo de Bouchardat).

Levou-se a secura 50 mL de cada fração do extrato hidroalcoólico e evaporado em banho-maria a 50°C. Dissolveu-se o resíduo em 1 mL de etanol e acrescentou-se 20 mL de HCl 1%. Para cada amostra testada foram feitos 5 tubos de ensaio, cada um com 1 mL do respectivo extrato clorídrico. O quinto tubo utilizou-se somente com o extrato, que serviu como controle negativo. Para cada tubo adicionou-se duas a três gotas de um reativo. Considerou-se positiva a presença de alcaloides na amostra com os seguintes precipitados:

Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.

Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.

4.4.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

As frações FH, FDCM, FAE e FEOH (10 mL) foram colocadas em cápsula de porcelana e levadas ao banho-maria até a secura. O resíduo foi dissolvido com 5 mL de álcool etílico. Posteriormente adicionou-se 5 gotas de HCl concentrado, levando ao aquecimento até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica que a reação é positiva.

4.4.1.3 Pesquisa de Heterosídeo Flavônico

Foi levada a secura em cápsula de porcelana 20 mL das frações: FH, FDCM, FAE e posteriormente dissolvidas em 10 mL de etanol. Cada fração teve 5 mL transferidos para respectivos tubos de ensaio, sendo que FEOH não passou pela secura e foi transferida diretamente ao tubo de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200 mg de limalha de ferro e HCl fumegante lentamente. O resultado positivo é observado quando ocorre o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.4.1.4 Pesquisa de Flavonóis

Esta pesquisa é realizada pelo teste do ácido Oxálico Bórico ou reação de Taubock. Para tal, 10 mL de cada fração foram levados à secura, depois adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), levando novamente a secura, a este resíduo foram adicionados 5 mL de éter etílico. A visualização foi realizada em ultravioleta, se houver fluorescência a reação é considerada positiva.

4.4.1.5 Pesquisa de Cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas concentrou-se as frações até 5 mL em banho-maria, através da secagem de 30 mL a 50°C, e recuperação com acetato de etila (5 mL). A fração hidroalcoólica foi levada até pH 1 por adição de HCl 2N e 5 mL de HCl concentrado. Esta mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 vezes de 10 mL). Essas frações foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5 mL.

Das frações obtidas transferiu-se 3 mL para tubos de ensaio, onde adicionaram-se 2 mL de NaOH 2N. Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366 nm por 15 min. Para reação positiva é observada fluorescência azul ou verde amarelada.

Paralelamente, com o restante dos extratos etéreos, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1 cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, colocou-se uma moeda, depois foram levadas à câmara de ultravioleta a 365 nm, novamente deixando em exposição por 15 min. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.4.1.6 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30 mL das frações e 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por 30 min, e posteriormente filtrada, adicionando-se 30 mL de água destilada.

Transferiu-se para um funil de separação, para extração com éter (2 vezes de 10 mL). Os extratos etéreos foram reunidos e concentrados em banho-maria, até um volume de 5 mL, e colocados em um tubo de ensaio, adicionando-se 5 mL de NH_4OH (Reação de Borntraeger) e agitando lentamente. A reação é considerada positiva com observação de coloração vermelha.

4.4.1.7 Pesquisa de Esteroides e Triterpenos

As frações (10 mL) foram evaporadas até secar em banho-maria e os resíduos redissolvidos em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0 mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2 mL com clorofórmio.

Reação de Liberman-Bouchard:

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H_2SO_4 concentrado lentamente. A formação da coloração rósea escura indica positivo para a função carbonila e/ou azul indica reação positiva para a função carbonílica na posição 3 e ligação dupla nas posições 5 e 6. A coloração verde indica função hidroxila e dupla ligação entre 5 e 6. Coloração amarela indica grupamento metila no carbono 14.

Reação de Keller Kelliani:

Levou-se à secar 2 mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Transferiu-se então as misturas para tubos de ensaio contendo 2 mL de H_2SO_4 .

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

azul: esteroides;

verde: triterpenos.

4.4.2 Preparo do Extrato Aquoso de *Lobelia exaltata* Pohl

O extrato aquoso foi preparado com 40 g do vegetal seco e fragmentado e 200 mL de água em banho Maria a 70°C por 1 h. Depois o extrato foi filtrado e completado o volume com água purificada até 200 mL lavando o material com o líquido extrator.

4.4.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos

Foi preparado uma estante com 3 tubos de ensaio e pipetado 5 mL do extrato aquoso em cada tubo. No primeiro adicionou-se HCl 1% até pH 4, que foi determinado com o auxílio de uma fita indicadora de pH. A reação é considerada positiva com o aparecimento de tons avermelhados. O segundo foi alcalinizado com NaOH até pH 10, e se positivo observa-se tons azulados. O terceiro foi neutralizado a pH 7 com o aparecimento de tons violáceos. Depois 10 mL do extrato aquoso foram extraídos com álcool butílico em funil de separação por duas vezes. Reuniu-se as duas frações obtidas em uma cápsula de porcelana e concentradas até 5 mL. Foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e aquecidos até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antocianidina.

4.4.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

Para esse teste foram utilizados 3 tubos de ensaio com a mesma quantidade de extrato, esses foram agitados energicamente por 5 min medindo em seguida o anel de espuma formada. Após repouso de 30 min, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

4.4.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogênicos

A um tubo de ensaio, foram adicionados 5 mL do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1ml de H₂SO₄ 10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60°C) por 30 min. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

Para preparar o papel picro-sódico tiras de papel de filtro com 1cm de largura são embebidas em solução de ácido pícrico 1% e secas ao abrigo da luz.

As tiras pícricas secas são então embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

4.4.2.4 Pesquisa de Taninos

Foram adicionados a 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. Quando ocorreu a formação de precipitado escuro 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um balão de fundo chato de 100 mL e nele foram acrescentados 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. A mistura foi levada para o refluxo por 1 h. Após seu resfriamento, a solução foi filtrada e o material retido foi lavado com água destilada e álcool. Ao material retido no filtro adicionaram-se gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. A formação de coloração indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e 3 – 4 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.4.2.5 Pesquisa de Ácidos Voláteis

Acidificou-se 10 mL do extrato aquoso com ácido sulfúrico 1N. O tubo de ensaio foi levado a fervura e com o auxílio de fita indicadora de pH, determinou-se o pH dos vapores. A presença desses ácidos é indicada pela coloração da fita para valores de pH abaixo de 7.

4.4.2.6 Pesquisa de Ácidos Fixos

Em um balão, foram adicionados 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de NaOH 1N, que permaneceram em refluxo por 30 min. Após resfriamento, acidificou-se

com H_2SO_4 2N e extraiu-se com éter etílico (3 porções de 10 mL). Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50°C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa por 10 min, resfriado e adicionados 5 mL de NH_4OH 1N. Em uma tira de papel de filtro concentraram-se duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos.

4.4.2.7 Pesquisa de Amino Grupo

Neste teste 10 mL do extrato aquoso foram concentrados em banho-maria a 60°C até 5 mL. Com o auxílio de um bastão de vidro foram feitas duas manchas em papel de filtro. Em uma das manchas foi gotejado o reativo de Nihidrina, deixando a outra mancha como comparativo para referência. O papel de filtro foi levado à estufa à temperatura de 100°C durante 5 min. A formação de coloração azul violácea indica reação positiva.

4.5 PESQUISA FITOQUÍMICA

4.5.1 Obtenção do extrato etanólico bruto

A um aparelho de Soxhlet modificado segundo Carvalho (2001) foi conectado um condensador de bolas e um balão de fundo chato contendo pérolas de vidro. Foram introduzidos 2,9 kg do material vegetal seco e triturado. A este sistema foi adicionado álcool etílico 96°GL até o volume de 6000 mL para a extração. No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atinge o ponto de refluxo, o extrato é descarregado no balão por sifonamento e o processo repetido 10 vezes (FIGURA 13). Este procedimento previne a

degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema e é capaz de solvatar os compostos presentes (CARVALHO, 2001). O extrato obtido foi concentrado em Soxhlet para posterior particionamento.

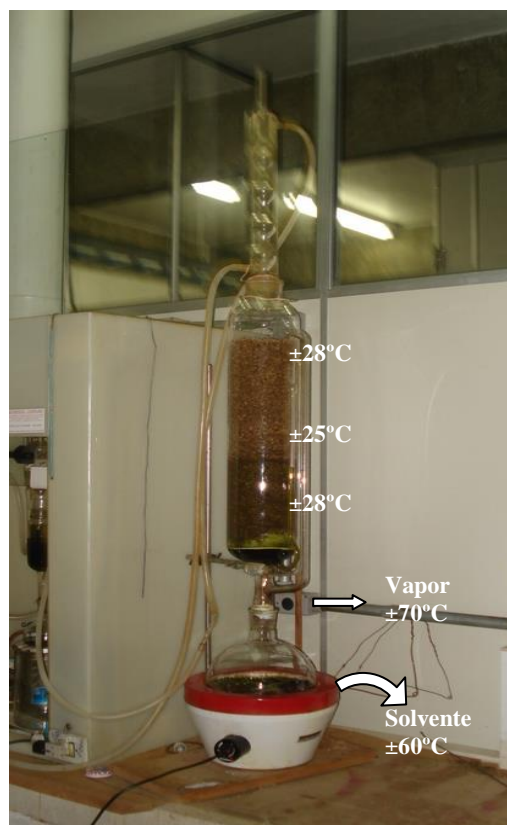


FIGURA 13. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO EM APARELHO DE SOXHLET.

FONTE: AUTORA, 2012.

O teor de sólidos foi determinado segundo a metodologia da Farmacopeia Brasileira V (2010). Foram pipetados volumetricamente 10 mL do extrato bruto e transferidos para uma placa de Petri previamente dessecada. A placa foi acondicionada em estufa a 105°C até peso constante. A diferença entre a massa da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia forneceu o teor de sólidos por 10 mL do extrato.

Aproximadamente 5 g do extrato bruto obtido foi reservado para a realização dos ensaios biológicos, sendo o restante destinado ao particionamento.

4.5.2 Fracionamento do Extrato Bruto

A partição líquido-líquido consiste na separação dos componentes de uma mistura baseado nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis, propicia uma semi-purificação dos constituintes aplicados à extração (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

O extrato bruto (EB) de *L. exaltata* foi particionado por meio de aparelho de Soxhlet modificado conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora, deixado sob refluxo por cerca 4h ou até esgotamento. Foram utilizados solventes em escala de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila. As frações obtidas foram concentradas em Soxhlet, levadas a secar em banho-maria a 60°C, pesadas e armazenadas em geladeira para posterior estudo, tendo sido nomeadas como fração hexano (FH), fração diclorometano (FDCM), fração acetato de etila (FAE) e fração hidroalcoólica remanescente (FEOH). Todos os solventes utilizados apresentam padrão analítico (PA). O fracionamento do EB está demonstrado na FIGURA 14.

4.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As frações foram previamente analisadas através de métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada e por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE). Para as análises de cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas cromatoplasmas de sílica Sílica-gel 60 F254 Merck® 0,063–0,200 mm. A purificação das frações foi realizada por meio de colunas cromatográficas abertas (CC). As frações FH, FCDM e FAE foram submetidas a CC com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200 mm.

Todas as frações foram empacotadas em CC com sílica gel e hexano a 100%.

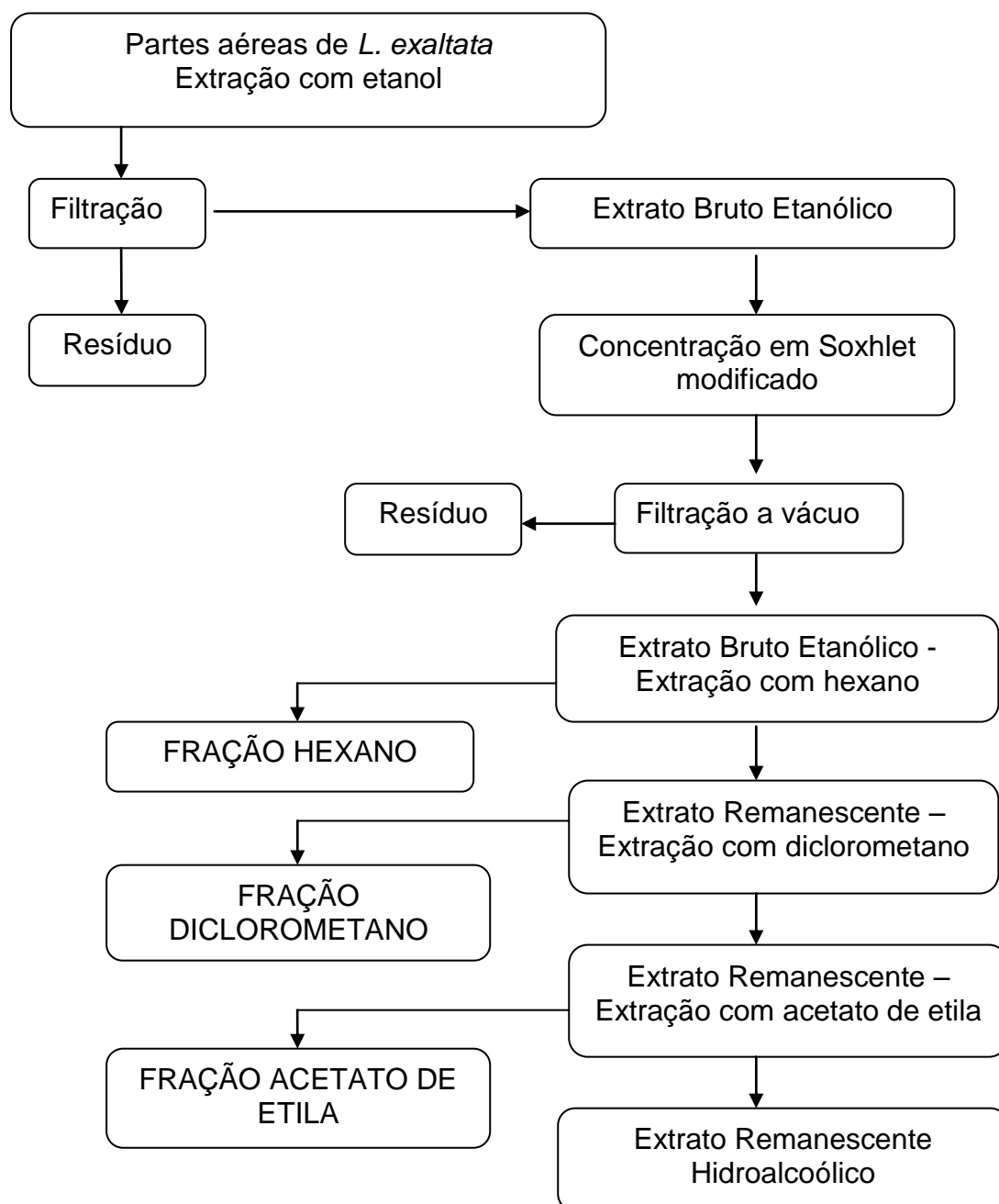


FIGURA 14 ESQUEMA ILUSTRATIVO DA OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO.

4.6.1 Fração hexano

A fração hexano foi dividida em duas partes, cada parte foi cromatografada com fases móveis distintas e denominadas FH-1 e FH-2.

4.6.1.1 Fração hexano 1 (FH-1)

Fração hexano 1 (35,4 g) foi submetida a CC e eluída com a mistura de solventes hexano/acetato de etila. A fase móvel iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 50% de acetato de etila. Foram coletadas 131 frações. Após a evaporação do solvente, as frações que apresentaram uma precipitação de cristais no fundo do frasco com melhor rendimento, foram reunidas e originaram as subfrações: HE-I, HE-II e HE-III, conforme TABELA 1.

Essas subfrações foram purificadas com hexano e depois metanol para limpeza de óleos, pigmentos e impurezas e centrifugadas quando necessário. Após a purificação obteve-se HE-I (127 mg), HE-II (80,6 mg) e HE-III (29,8 mg). Posteriormente, estes cristais foram submetidos às análises espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais para a elucidação de sua estrutura química.

TABELA 1 - SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO NA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DE FH-1.

Frações	FH-1	
	Hexano (%)	Acetato Etila (%)
01 ao 04	100	0
05 ao 17	95	5
18 ao 28 (HE-I)	90	10
29 ao 38 (HE-II)	85	15
39 ao 48	80	20
49 ao 55	75	25
56 ao 65 (HE-III)	70	30
66 ao 75	65	35
76 ao 92	60	40
93 ao 111	55	45
112 ao 131	50	50

4.6.1.2 Fração hexano 2 (FH-2)

Fração hexano 2 (19,21 g) foi cromatografada utilizando a fase móvel hexano/clorofórmio e clorofórmio/metanol. A fase móvel iniciou com 30% de hexano, tendo clorofórmio como gradiente de polaridade, com variação de 5% até 100% de clorofórmio. Seguida da eluição com clorofórmio/metanol, com variação de 5% até 100% de metanol. Foram coletadas 100 frações e de forma semelhante ao item 4.6.1 as sub frações H-I (15,5 mg), H-II (40,1 mg), H-IV (22,9 mg), H-V (8, 7 mg) foram obtidas. O esquema de fracionamento está demonstrado na TABELA 2:

O composto H-I foi enviado para análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C para elucidação de sua estrutura química.

TABELA 2 - SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO NA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DE FH-2.

Fração H-2			
Fração	Hexano (%)	Clorofórmio (%)	Metanol (96%)
01 ao 05	30	70	-
06 ao 09 (H-IV)	25	75	-
10 ao 13	20	80	-
14 ao 18	15	85	-
19 ao 23	10	90	-
24 ao 29	05	95	-
30 ao 35 (H-I)	00	100	00
35 ao 42 (H-V)	-	95	05
43 ao 47 (H-II)	-	90	10
48 ao 52 (-	85	15
53 ao 57	-	80	20
58 ao 64	-	75	25
65 ao 69	-	70	30
70 ao 76	-	65	35
77 ao 82	-	60	40
83 ao 88	-	55	45
89 ao 92	-	50	50
92 ao 100	-	-	100

4.6.2 Fração diclorometano

A fração diclorometano (FDCM) (67,5g) foi cromatografada utilizando a fase móvel hexano/clorofórmio e clorofórmio/metanol. A fase móvel iniciou com 100% de hexano, tendo clorofórmio como gradiente de polaridade, com variação de 5% até 100% de clorofórmio. Seguida da eluição com clorofórmio/metanol, com variação de 5% até 100% de metanol. À fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200 mm foi adicionada uma solução aquosa de bicarbonato de sódio a 10% e após agitar e descansar por alguns minutos a sílica foi filtrada e levada à estufa para ativação.

A FDCM resultou em 201 frascos. As subfrações, 17 a 38 e 97 a 107 foram reunidas e renomeadas como L1 e L2 respectivamente. Foram realizadas CCDs utilizando fase móvel metanol/amônia (100:1,5 mL) para verificar a presença de alcaloide.

4.6.3 Fração acetato de etila

A fração acetato de etila (FAE) (5,37 g) foi cromatografada em CC utilizando a fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. A fase utilizada iniciou com 40% de hexano até 100% de acetato de etila, e de 100% de acetato de etila até 50% de metanol, e para limpeza da coluna foram utilizados 100% de metanol (TABELA 3). Os compostos foram obtidos após a evaporação do solvente, que promoveu a cristalização dos mesmos, com a formação de cristais brancos a levemente amarelados. Esses cristais foram lavados com metanol para retirada da resina oleosa e outras impurezas e centrifugados quando necessário, os frascos semelhantes foram reunidos e após a secagem foi observada a formação de cristais puros ou semi-puros.

As subfrações foram purificadas com acetato de etila e metanol para limpeza de óleos, pigmentos e impurezas, e denominadas AI, AII, AIII, AIV, AV, AVI e AVII.

Uma pequena parte da FAE (1 mg) foi submetida à CLAE em aparelho Merck-Hitachi, com bomba L2130, detector DAD L2450, Interface L7000, conectado ao sistema operacional Windows XP e coluna XTERRA C18 de fase reversa, a temperatura em torno de 25°C. O detector de arranjos de diodos

(DAD), configurado pra realização de varredura entre 200 a 400 nm. A fase móvel utilizada foi metanol e fase ácida, por gradiente de concentração em fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, conforme descrito na TABELA 4.

TABELA 3 - SISTEMA DE ELUIÇÃO UTILIZADO NA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DE FAE

FAE			
Eluição	Hexano (%)	Acetato de etila (%)	Metanol (%)
1 ao 5	40	60	-
6 ao 12 (A-I)	35	65	-
13 ao 18 (A-III)	30	70	-
19 ao 29 (A-IV e A-V)	25	75	-
30 ao 35	20	80	-
36 ao 41 (A-II)	15	85	-
42 ao 47	10	90	-
48 ao 55	5	95	-
56 ao 63	0	100	0
64 ao 70	-	95	5
71 ao 78 (A-VI)	-	90	10
79 ao 86	-	85	15
87 ao 92	-	80	20
93 ao 96	-	75	25
97 ao 100	-	70	30
101 ao 106	-	65	35
107 ao 111	-	60	40
112 ao 118	-	55	45
119 ao 121	-	50	50
122 ao 126	-	0	100

Os cristais foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H uni e bidimensionais.

TABELA 4 - DADOS DE ANÁLISE EM CLAE PARA A FAE

Tempo	%Fase ácida	%Metanol	Vazão (mL/min)
0,0	95,0	5,0	1,000
17,0	5,0	95,0	1,000
18,0	5,0	95,0	1,000
19,0	5,0	95,0	1,000
21,0	95,0	5,0	1,000
23,0	95,0	5,0	1,000

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Brucker® modelo AC400 operando na frequência base de 400 MHz e 100 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , realizada no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela Professora Dra. Barbara Fiorin.

Aproximadamente 10 mg de cada amostra foi solubilizada em 600 μL de dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) e CDCl_3 (clorofórmio deuterado) e como referência interna utilizou-se TMS (tetrametilsilano, cujo sinal aparece em 0 ppm). Foram realizados os experimentos de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e 90°, $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY, HMBC e HSQC.

4.7 ANÁLISES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.7.1 Atividade Antioxidante

4.7.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas. Possui a vantagem de avaliar a capacidade

antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (PRIETO, PINEDA E AGUILAR, 1999).

O reativo foi preparado através da adição de uma solução com fosfato de sódio 0,1 M (28 mL), molibdato de amônio 0,03 M (12 mL) e ácido sulfúrico 3 M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em etanol.

Em tubo de ensaio, foram adicionados 3 mL de reativo e 0,3 mL de cada amostra. Este procedimento foi realizado para os padrões e para o branco (no qual foi utilizado metanol). A análise foi realizada em triplicata.

Os tubos hermeticamente fechados foram colocados em banho-maria a 95°C por 90 min. Após o resfriamento, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 695 nm, em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação à rutina (200 µg/mL) e vitamina C (200 µg/mL), usadas como padrão. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina. Os resultados foram calculados conforme as equações:

$$AAR\% \text{ EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (Vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$AAR\% \text{ EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (Rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

4.7.1.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O potencial de redução de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foi determinado segundo metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001) que avalia a

capacidade antioxidante quantitativa tendo como base este princípio da redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível.

Foram preparadas soluções metanólicas das amostras e dos padrões (rutina e vitamina C) em diferentes concentrações, das quais alíquotas de 2,5 mL foram adicionadas a 1 mL de uma solução metanólica de DPPH, recém preparada, na concentração de 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Como padrões foram utilizados a vitamina C nas concentrações entre 2 µg/mL e 5,5 µg/mL. Todas as etapas foram feitas em triplicata. Após os 30 min, mediu-se a absorbância das soluções em 518 nm correspondente a absorção máxima do radical em estudo e mediu-se a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) através da fórmula:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 100 - \left\{ [(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}) / Abs \text{ controle positivo}] \times 100 \right\}$$

4.7.1.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método utilizado foi segundo Moraes *et al.* (2006) com modificações.

Os extratos e frações secos foram preparados na concentração de 70 µg/mL em etanol e retirados 0,1 mL. A essa alíquota foi adicionado 0,4 mL de H₂O, 0,5 mL de solução de gema de ovo a 5% (p/v) em solução de SDS 0,55% (dodecil sulfato de sódio), 50 µL de ABAP 0,035M (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de uma TBA 0,4% (ácido tiobarbitúrico) preparada em solução de SDS 0,55% e então levado ao banho-maria a 95°C por 1 h. Após o resfriamento da solução adicionou-se 1,5 mL de 1-butanol, para extração da fase orgânica. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min. Em seguida realizou-se a leitura do sobrenadante a 532 nm. Como branco foi utilizado o 1-butanol. E como controle negativo foi utilizado a mesma solução, sendo nesta a amostra substituída por 0,1 mL de etanol. O teste foi realizado em quintuplicata.

As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$IA\% = [1 - (Abs A / Abs CN)] \times 100$$

4.7.2 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado segundo Meyer *et al* (1982) e consiste em um ensaio biológico rápido, de baixo custo.

4.7.2.1 Preparo da Solução Salina

A água do mar artificial foi preparada com 38 g de sal marinho (23 g NaCl, 11g MgCl₂·6H₂O, 4g Na₂SO₄, 1,3g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O, 0,7g KCl) e 1000 mL de água purificada. O pH foi ajustado para 9 com Na₂CO₃ para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. O desenvolvimento de *Artemia salina* se dá em um pH superior a 6, porém um pH superior a 10,5 deve ser evitado (LEWAN *et al.*, 1992).

4.7.2.2 Preparo da Amostra

O estudo foi realizado com o extrato bruto (EB) e as frações hexano (FH), fração diclorometano (FDCM) e fração acetato de etila (FAC), fração hidroalcoólica (FEOH). As amostras foram levadas à secura em banho-maria (40°C), foram pesados aproximadamente 20 mg e foi adicionado solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10 mg/mL. Os solventes utilizados foram etanol para EB, FH e FAE e água para a FDCM,

FEOH de acordo com a solubilização das amostras. Desta solução foram transferidos 5, 50 e 500 µL com pipeta automática para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000 µg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 h (DALL' STELLA, 2008).

4.7.2.3 Eclosão dos Ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados em água salgada para eclodir por 48 h sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo o recipiente foi mantido sob iluminação (20 W).

4.7.2.4. Avaliação da Toxicidade

Após a eclosão dos ovos, foram transferidas 10 larvas de *Artemia salina* para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, o qual foi evaporado juntamente com as amostras, além de tubos vazios. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 5 mL. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, os quais foram evaporados juntamente com as amostras. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina. Após 24 h, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente. Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL₅₀ e 95% de intervalos de confiança. As frações serão consideradas ativas quando DL₅₀ foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

4.7.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada *in vitro* utilizando-se o método da microdiluição (GROVE e RANDALL, 1955; NCCLS, 1993; NCCLS, 1998; ANVISA, 2003; VALGAS, 2007; ANVISA, 2008).

Os microrganismos utilizados nos testes foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) levando-se em consideração a disponibilidade de cepas padrão.

O material utilizado (vidrarias, pinças) foi esterilizado em autoclave a 120°C, por 30 min.

4.7.3.1 Método de Microdiluição (Determinação da Concentração Inibitória Mínima).

O método de microdiluição da amostra em meio de cultura líquido utiliza placas estéreis (com tampa) de cultura de células com fundo redondo de 96 poços, e é eficaz na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ANVISA, 2003).

As amostras foram testadas em diferentes diluições, partindo de 1000 µg até chegar em 15,7 µg na última diluição. O primeiro poço onde não se observou crescimento bacteriano foi considerado a concentração inibitória mínima.

4.7.3.2 Preparo do inóculo

As cepas dos microrganismos foram semeadas em placas de ágar sangue no dia anterior ao experimento para que as bactérias e leveduras ainda estivessem em sua curva de crescimento.

As cepas em teste foram diluídas em caldo *Muller Hinton* até alcançar entre 80 e 90% de transmitância em espectrofotômetro a 585 nm, o que corresponde a escala 0,5 de Mac Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL). Foram inoculadas 10 µl da cepa bacteriana previamente diluída em 170 µl do meio (caldo *Muller Hinton*) e 20 µl do

teste. O controle negativo foi realizado com Perio Gard® (0,12% de clorexidina) e para o controle positivo foi colocado apenas a cepa bacteriana (como preparada para as amostras) no caldo *Muller Hinton*. Ainda foi feito um controle com o solvente utilizado na diluição das amostras para verificar se o mesmo não interferiu no crescimento bacteriano.

As placas foram fechadas e mantidas em estufa a 35°C por um período de 18 a 24 h.

4.7.3.3 Concentração Inibitória Mínima

Após incubação, foi efetuada a leitura da concentração mínima capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano. Para melhor visualizar o crescimento foi utilizado um corante avermelhado, preparado no momento da leitura, o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolico. Os poços com crescimento bacteriano ficam corados de vermelho após 30 min da adição de 50 µl do corante. A concentração inibitória mínima foi considerada a partir do poço que não ficou corado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5 FLUXOGRAMA DA PESQUISA

As principais etapas do desenvolvimento da pesquisa estão ilustradas na FIGURA 15.

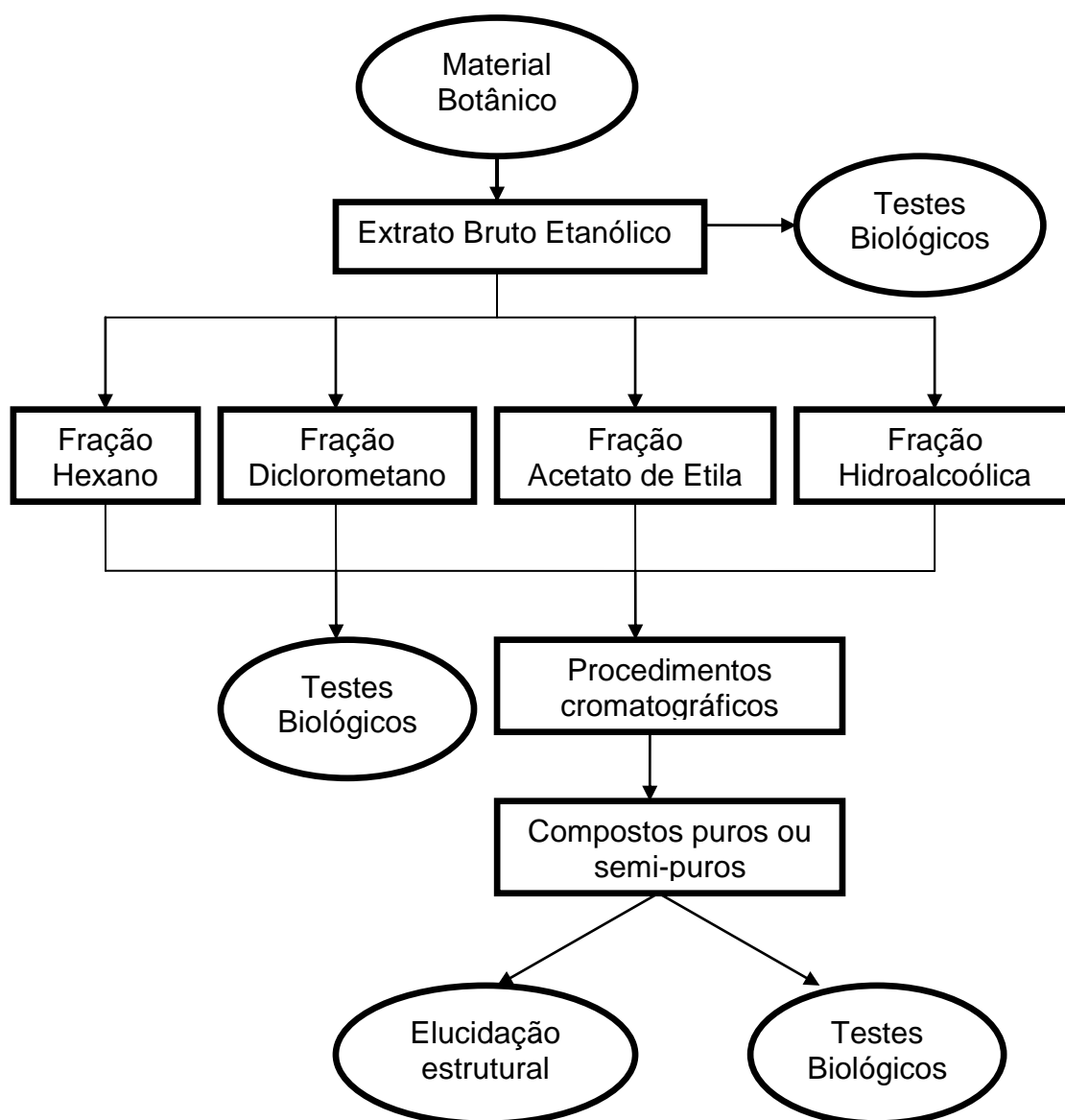


FIGURA 15. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 MATERIAL VEGETAL E CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material vegetal selecionado para a presente investigação fitoquímica e biológica foram as partes aéreas da espécie vegetal conhecida popularmente por lobelia ou arrebenta cavalos. Alguns ramos férteis desta herbácea foram coletados visando à preparação de exsicatas que foram enviadas a taxonomistas. O resultado obtido desta identificação científica foi *Lobelia hassleri* A. Zahlb (Campanulaceae). Após mais de um ano de estudo fitoquímico com este material vegetal e intensa pesquisa bibliográfica optou-se por realizar o estudo morfoanatômico da espécie, visto que não havia nenhuma referência deste tipo de estudo na literatura. Uma nova exsicata foi então enviada ao Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que realizou um estudo minucioso da exsicata e chegou à conclusão que a espécie vegetal era na verdade *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae) onde ficou catalogada sob registro ICN - Nº 192140.

Diante desta problemática, ressaltamos a importância das pesquisas científicas serem de caráter multidisciplinar, como por exemplo, a botânica, a farmacologia, a microbiologia e a fitoquímica, pois juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural, a flora mundial (MACIEL *et al*, 2002).

Novas revisões bibliográficas foram realizadas e não foram encontrados artigos publicados na área de investigação fitoquímica e nem tampouco na área morfoanatômica e de atividades biológicas com a espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl. Todos os constituintes químicos isolados e identificados, as avaliações biológicas e o estudo morfoanatômico foram inéditos para a espécie vegetal *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae).

6.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A análise morfológica de *Lobelia exaltata* (FIGURA 16A) evidencia erva medindo 1,5-2m de altura, com caules de 1,5-2 cm de diâmetro, coberto com folhas em quase toda a extensão e terminando pela inflorescência (FIGURA 16E). O caule é estriado, glabro e fistuloso. As folhas (FIGURA 16B) são sésseis, glabras, penínérveas, medindo de 16-40 cm de comprimento e 2-6cm de largura com uma nervura principal que mostra-se arroxeadada. O formato varia de lanceolado a sublinear, o ápice é agudo-acuminado, a base é levemente atenuada, a margem é denticulada e a filotaxia é alterna. O bordo foliar apresenta-se levemente recurvado para cima. Os caracteres morfológicos observados para *L. exaltata* vão ao encontro dos relatos de Trinta e Santos (1989) e Takeda e Farago (2001) para essa espécie.

Na análise anatômica da lâmina foliar de *L. exaltata*, em secção transversal, a epiderme apresenta-se uniestratificada (FIGURA 17C), sendo que as células epidérmicas da face adaxial são, comparativamente, maiores que as células da face abaxial. Em vista frontal, o revestimento epidérmico apresenta paredes anticlinais retas e delgadas, em ambas as faces. A cutícula mostra-se estriada e delgada em ambas as superfícies (FIGURAS 14C, 14D, 17A, 17B).

Contudo, *Lobelia langeana* Dusén (BORIO, 1959), em vista frontal, mostrou células de paredes anticlinais ondeadas em ambas as faces e *Lobelia inflata* L. evidenciou células de paredes anticlinais muito sinuosas na face adaxial e ondeadas na face abaxial (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977). Adicionalmente, espécies xerofíticas da família Campanulaceae podem evidenciar hipoderme fibrosa, entretanto, essa característica não foi encontrada neste estudo.

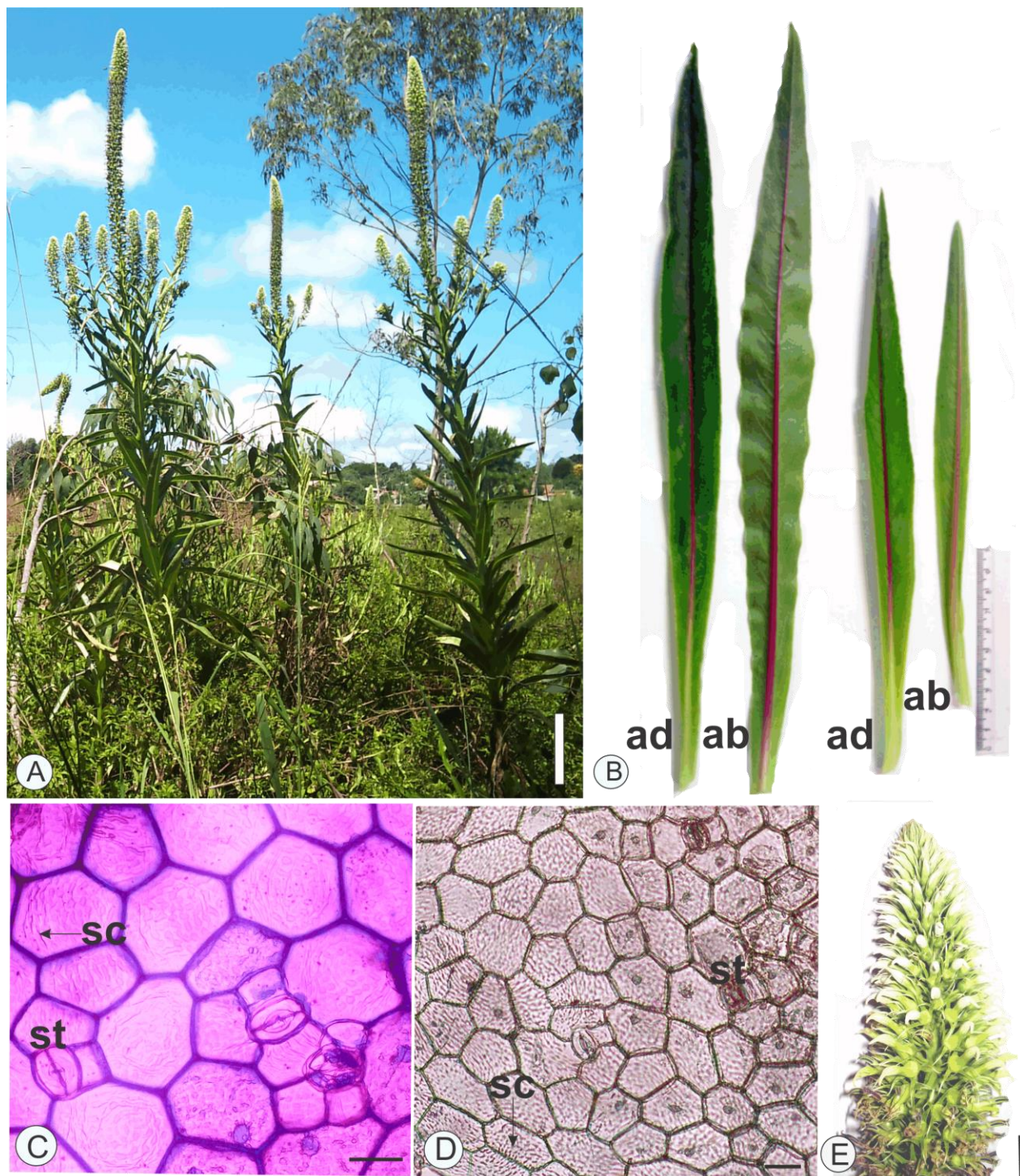


FIGURA 16. *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae. (A) ASPECTO DOS ÓRGÃOS AÉREOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS. (B). ASPECTO DAS FOLHAS. (C). FACE ADAXIAL DA EPIDERMIS REVELANDO PAREDE CELULAR COM EPIDERMIS ANTICLINAL, CUTÍCULA ESTRIADA E ESTOMATOS. (D) FACE ABAXIAL DA EPIDERMIS MOSTRANDO PAREDE CELULAR COM EPIDERMIS ANTICLINAL, CUTÍCULA ESTRIADA. (E) INFLORESCÊNCIA. Nota: - sc: cutícula estriada, st: estômato. Bar = 15cm (A); 1cm (E); 20µm(C); 50 µm (D).

A folha é anfiestomática e os estômatos são do tipo anisocítico (FIGURAS 16C, 16D) e estão localizados no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 17C). A característica anfiestomática da folha é relatada para Campanulaceae (LAMMERS, 2007) e também foi observada em *L. langeana* (BORIO, 1959). Hidatódios são frequentemente encontrados associados aos dentes marginais das folhas de espécies da família (LAMMERS, 2007). Todavia, não foram observados neste trabalho.

Em Campanulaceae, os tricomas tectores são normalmente unicelulares, podendo ocorrer pluricelulares unisseriados enquanto que tricomas glandulares não foram mencionados na família (LAMMERS, 2007). Nos bordos denteados das folhas de *L. langeana* foram encontrados grupos de 2-3 tricomas tectores unicelulares caducíssimos e tricomas glandulares pluricelulares, formados de 2-3 células de paredes delgadas e lisas (BORIO, 1959). Esse autor destaca que no fármaco pulverizado, os tricomas não são encontrados com facilidade, pois caem pelo simples toque. Tricomas tectores unicelulares cônicos, localizados na face abaxial, foram evidenciados em *L. inflata* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977). Divergindo da constatação geral, neste estudo, *L. exaltata* não evidenciou a presença de tricomas.

O mesofilo típico de Campanulaceae é dorsiventral e compreende tipicamente 1-2 camadas de parênquima paliçádico (LAMMERS, 2007). Na espécie em estudo, o mesofilo corresponde ao padrão da família, sendo constituído por uma camada de parênquima paliçádico e 6-8 camadas de parênquima esponjoso, estabelecendo espaços intercelulares. O parênquima esponjoso ocupa cerca de 2/3 do mesofilo. Feixes vasculares de pequeno porte do tipo colateral estão distribuídos na região mediana do mesofilo e são envoltos por bainha parenquimática (FIGURA 17C). Mesofilo dorsiventral também foi encontrado em *L. langeana* (BORIO, 1959) e em *L. inflata* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977).

A principal característica anatômica de Campanulaceae é a presença de laticíferos do tipo articulado anastomosado associada com o floema das folhas, caules, e órgãos florais (LAMMERS, 2007).

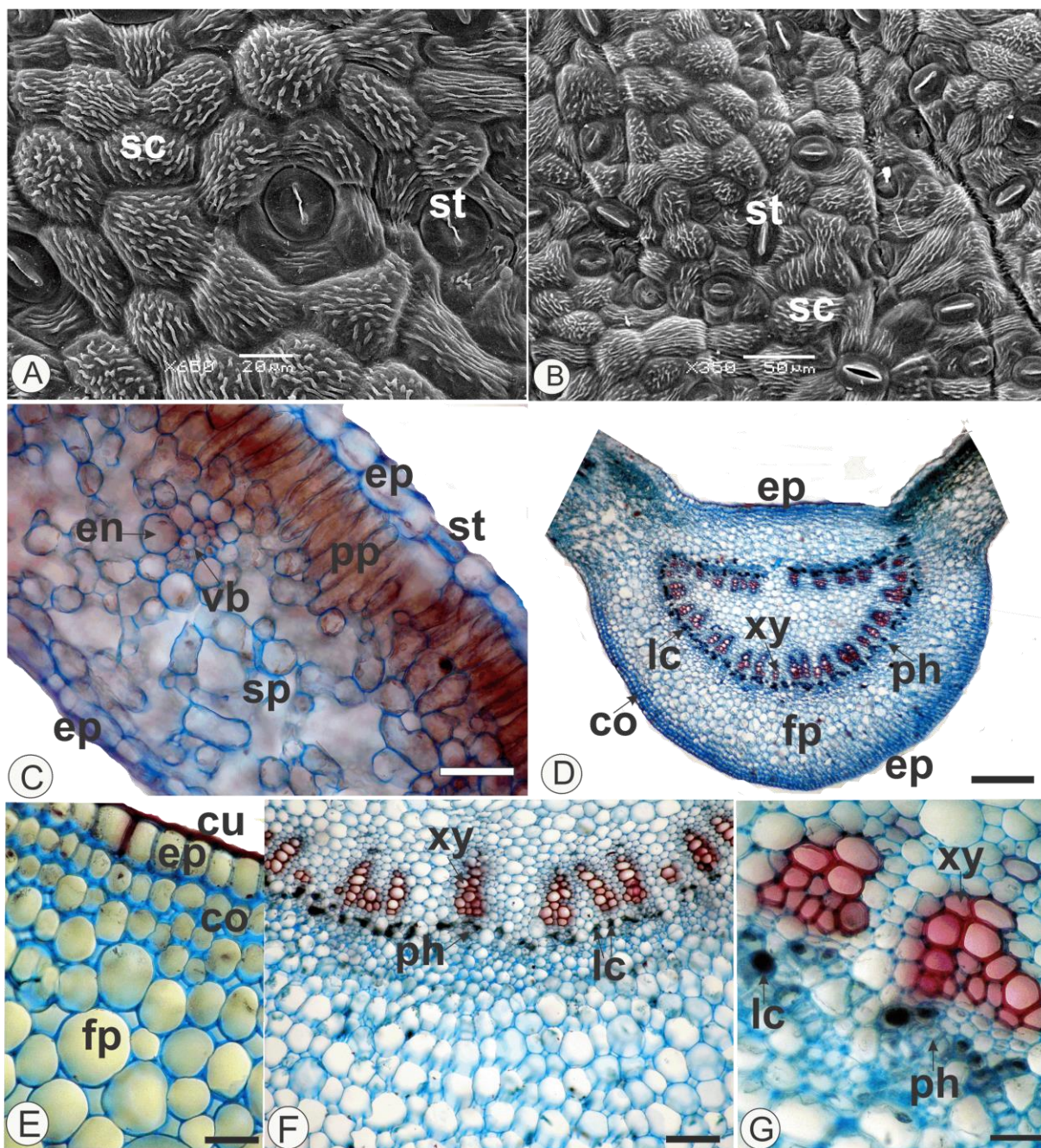


FIGURA 17. *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae. (A) e (B): EPIDERME EM VISTA FRONTAL (A): FACE ADAXIAL EXIBINDO ESTÔMATOS E CUTÍCULA ESTRIADA; (B): FACE ABAXIAL EXIBINDO ESTÔMATOS E CUTÍCULA ESTRIADA; (C): ORGANIZAÇÃO DA LÂMINA MOSTRANDO MESOFILO DORSIVENTRAL E FEIXE VASCULAR COLATERAL; (D): NERVURA MEDIANA MOSTRANDO CILINDRO VASCULAR MEDULAR; (E): DETALHE DA EPIDERME, CUTÍCULA, COLÊNQUIMA E PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL; (F): CILINDRO VASCULAR MOSTRANDO LATICÍFEROS NO XILEMA E NO FLOEMA; (G): DETALHE DO CILINDRO VASCULAR. Bar = 20 μ m (G), 50 μ m (C, E, F), 200 μ m (D).

Nota:- co: colênquima; cu: cutícula; ep: epiderme; fp: parênquima fundamental; lc: laticíferos; ph: floema; pp: parênquima paliçádico; sc: cutícula estriada; sp: parênquima esponjoso; st: esômato; vb: feixe vascular; xy: xilema.

Os laticíferos estão presentes em espécies de 36 famílias vegetais (JUDD *et al.*, 2002), muitas vezes sem relação taxonômica, sugerindo que eles surgiram mais de uma vez ao longo da história evolutiva destes grupos. Acredita-se que, o sucesso das plantas latescentes nos diversos ambientes seja devido à presença do látex que atua protegendo o vegetal contra a herbivoria e promovendo a cicatrização de injúrias (FAHN, 1979; FARRELL *et al.*, 1991).

O látex viscoso produzido em espécies de Campanulaceae normalmente é abundante e branco, mas em algumas espécies é colorido, por exemplo, amarronzado em *Lobelia excelsa* Bonpland, alaranjado brilhante em *Lobelia cordifolia* Hook. & Arn. ou amarelo-canário em *Cyanea leptostegia* A. Gray (LAMMERS, 2007). No presente estudo, *L. exaltata* evidenciou látex viscoso de coloração branca e os laticíferos foram encontrados no sistema floemático (FIGURAS 17D, 17F, 17G, 18A, 18B, 18C, 18D). Desta mesma forma, os laticíferos foram encontrados em *L. langeana* (BORIO, 1959) e em *L. inflata* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1977).

A nervura central, em secção transversal, possui formato praticamente côncavo-convexo, estabelecendo evidente curvatura junto à face abaxial. A epiderme uniestratificada é revestida por cutícula estriada e delgada (FIGURA 17E) e, subjacente, o clorênquima se interrompe e são encontradas 2-3 camadas de colênquima angular em ambas as faces. O sistema vascular é constituído por vários feixes colaterais formando um arco fechado (FIGURA 17D). No floema são observados laticíferos e o xilema é constituído por elementos de vaso dispostos em fileiras (FIGURA 17D, 17F, 17G). Essas mesmas características referentes ao sistema vascular foram observadas em *L. langeana*, entretanto, a nervura central, seccionada transversalmente, mostrou formato praticamente plano-convexo e não foi observado colênquima nessa espécie.

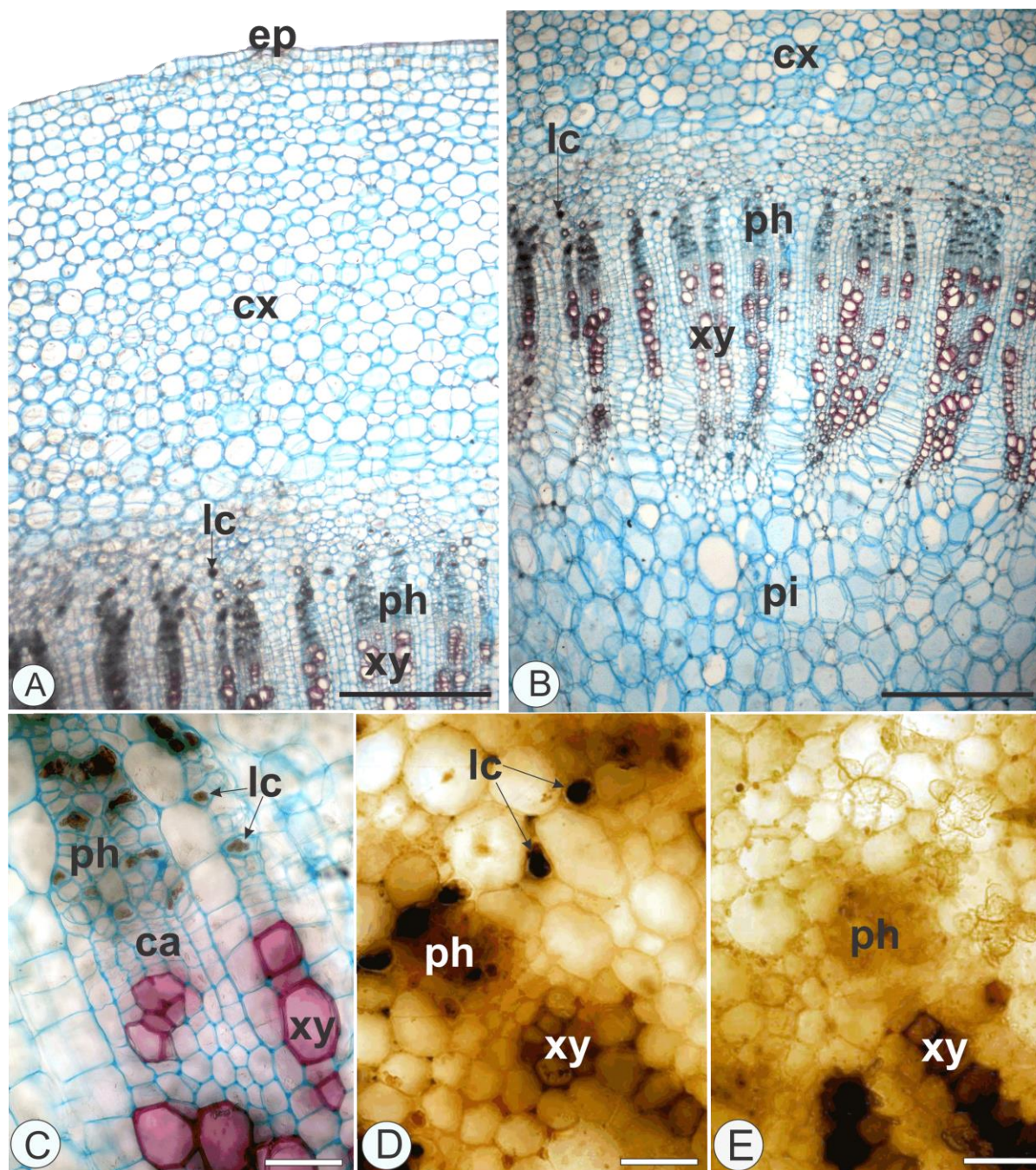


FIGURA 18. *Lobelia exaltata* Pohl, Campanulaceae. – CAULE EM SEÇÃO TRANSVERSAL – (A). CAULE MOSTRANDO EPIDERME, CÓRTEX, LATICÍFEROS, FLOEMA E XILEMA (B). CAULE INDICANDO, CÓRTEX, LATICÍFEROS, FLOEMA, XILEMA E MEDULA. (C). DETALHE DO SISTEMA VASCULAR REVELANDO ZONA CAMBIAL, XILEMA E LATICÍFEROS NO FLOEMA. (D) CAULE EM REAÇÃO COM REATIVO DE BOUCHARDAT EXIBINDO LATICÍFEROS. (E). CAULE COM REATIVO DE BOUCHARDAT, INDICANDO FLOEMA E XILEMA. Bar = 200 μ m(A, B), 20 μ m (C, D, E).

Nota: - ca: zona cambial, cx: córtex, ep: epiderme, lc: laticíferos, pi: medula, ph: floema, xy: xilema.

No caule de Campanulaceae, o cilindro vascular é contínuo e os feixes medulares estão presentes com frequência. Neste estudo, o caule de *L. exaltata*, seccionado transversalmente, mostrou formato praticamente circular. A epiderme é uniestratificada e a cutícula mostra-se delgada e lisa. Adjacente à epiderme, encontra-se um córtex bem desenvolvido com cerca de 25 camadas. As células que o compõem são arredondadas e aumentam de tamanho em direção ao cilindro central (FIGURAS 18A, 18B).

O cilindro vascular é contínuo e evidencia uma zona cambial constituída de 4-5 estratos, cujas células são tabulares e formam xilema no sentido centrípeto e floema, centrifugamente (FIGURA 18C). Elementos crivados, células parenquimáticas especializadas e laticíferos são distinguidos no floema (FIGURA 18C). Secções transversais do caule foram submetidas a tratamento específico e ao reativo de Bouchardat (BORIO, 1959) a fim de localizar os laticíferos. Desta forma, na FIGURA 18D, observa-se o resultado positivo e na FIGURA 18E o resultado negativo. No xilema, os elementos de vaso distribuem-se em fileiras separadas por raios medulares (FIGURAS 18A, 18B, 18C). A região medular possui parênquima com células relativamente grandes e de paredes delgadas (FIGURA 18B).

As características observadas no caule de *L. exaltata* também foram encontradas em *L. langeana*. Todavia, em *L. langeana* também foi evidenciada a presença de 2-3 camadas de colênquima e fibras no xilema.

6.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados obtidos para as análises físico-químicas do material da espécie vegetal em estudo estão demonstrados na TABELA 5. Todas as análises físico-químicas foram realizadas em septuplicatas e os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

TABELA 5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL

Análise	Material vegetal
Densidade g/mL	0,1966 ± 0,0103
Umidade (%)	15,71 ± 0,545
Cinzas totais (%)	6,12 ± 0,251

Os parâmetros para as análises do teor de umidade e cinzas totais estão sendo determinados pela primeira vez para a espécie *Lobelia exaltata*. A determinação destas análises é muito importante para o controle de qualidade, uma vez que, auxilia na confirmação da identidade botânica e permite a identificação de adulterações e materiais estranhos (pureza inorgânicas) na matéria-prima vegetal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SONAGLIO *et al.*, 2010). Estes dados são considerados parâmetros de qualidade, e são amplamente utilizados para garantir a confiabilidade dos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010).

O teor de cinzas de *L. exaltata* foi de 6,12%. Não existem teores máximos para cinzas totais estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo, entretanto mostrou-se abaixo do estabelecido na Farmacopeia Brasileira (1977) para *L. inflata* (10%), sendo também menor do que o encontrado para *L. langeana* (8,911%) (BORIO, 1959), *L. stellfeldii* (6,9 a 8%) (MOREIRA, 1979) e *L. hassleri* (7,5 a 8,5%) (MOREIRA, 1979). Isso indica que a espécie estudada não possui excesso de substâncias aderentes de origem terrosa que poderiam estar presentes como contaminantes.

6.4 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os ensaios sistemáticos de análise fitoquímica preliminares auxiliam na identificação dos grandes grupos de metabólitos secundários presentes na planta estudada, sendo utilizados como guia para a futura identificação de compostos puros.

Os resultados desta análise para as frações: FH, FDCM, FAE, FEOH da espécie *L. exaltata* estão apresentados nas TABELAS 6 e 7.

TABELA 6 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO

Grupo fitoquímico	Análise	FH	FDCM	FAE	FEOH
Alcaloides	Reativo Mayer	+	+	-	+
	Reativo Dragendorff	+	+	-	+
	Reativo Bouchardat	+	+	-	+
Flavonoides	Flavonoides	-	-	+	+
Cumarinas	Tubo	-	-	-	-
	Papel	-	-	-	-
Antraquinonas		-	-	-	-
Esteroides/triterpenos	Reação Liberman-Bouchard	+	+	-	-

Nota: +(positivo), – (negativo)

TABELA 7 – ANÁLISE SISTEMÁTICA DO EXTRATO AQUOSO

Grupo fitoquímico	Resultado
Heterosídeos Antociânicos	-
Heterosídeos Saponínicos	-
Heterosídeos Cianogênicos	-
Aminogrupos	+
Taninos	+
Ácidos Fixos	+
Ácidos Voláteis	-

Nota: +(positivo), – (negativo)

A análise sistemática fitoquímica preliminar dos extratos de *L. exaltata* demonstraram a presença de alguns grupos de substâncias como os alcaloides, flavonoides, esteroides/triterpenos, aminogrupos, taninos e ácidos fixos, com resultados mais expressivos para esteroides/triterpenos e alcaloides. Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Moreira (1979) para *L. hassleri* e *L. stellfeldii*. Ainda segundo Moreira (1979) alcaloides, amino-grupos, açúcares e

ácidos fixos são comuns também em outras espécies de *Lobelia*. Nagananda (2012) constatou a presença de alcaloides, fitoesteróis e açúcares em folhas, raízes, caules e inflorescência de *L. inflata*. Estudos realizados com *L. sessilifolia*, *L. chinensis* e *L. nicotianaefolia* reportaram a presença de esteroides, terpenos, cumarinas, alcaloides e flavonoides (KUO *et al*, 2011; TAMBOLI *et al*, 2012; SUN *et al*, 2012).

6.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Lobelia exaltata* Pohl.

A obtenção do EB é um método que garante a reprodutibilidade do extrato vegetal, necessária à realização das atividades químicas e biológicas, que são dependentes da composição química do extrato (CARVALHO, 2001).

O rendimento do EB obtido a partir da planta seca foi 10,684% que corresponde ao valor de 309,19 g do material vegetal de *L. exaltata*. Destes, foram retirados 5 g para realização das atividades biológicas, sendo o restante utilizado no particionamento para obtenção das frações. O rendimento das frações em relação à quantidade de EB utilizado está apresentado na TABELA 8.

TABELA 8 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM RELAÇÃO AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

FRAÇÃO	Rendimento	
	Massa (g)	Porcentagem(%)
Hexano	54,615	17,663
Acetato de etila	5,49	1,77
Diclorometano	117,888	38,128
Hidroalcoólica	56,568	18,295

A fração que apresentou o maior rendimento no processo de partição foi a FDCM (38,128%), e a de menor rendimento foi a FAE (1,77%). O resultado do ensaio sistemático de análises em fitoquímica realizado para as partes aéreas de

L. exaltata indicou por meio de reações características a presença de alcaloides e ainda esteroides e/ou triterpenos, portanto, está de acordo o perfil químico apresentado pelo gênero e com os rendimentos apresentados pelas frações analisadas, uma vez que os metabólitos majoritariamente encontrados no gênero se distribuíram de maneira seletiva, de acordo com o coeficiente de partição, pelos solventes utilizados apresentando maior rendimento aquelas frações onde se encontram os metabólitos descritos. (FELPIN e LEBRETON, 2004; JOSHI *et al.*, 2011; MA e WINK, 2008; NAGANANDA, 2012; SUN *et al.*, 2012; TAMBOLI *et al.*, 2012).

6.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

A investigação química da fração hexano FH-1 levou ao isolamento de uma mistura de compostos denominadas de HE-I, HE-II E HEIII e da FH-2, o isolamento das misturas, H-I, H-II, H-IV e H-V. O composto HE-II e a mistura H-II foram identificadas como descrito a seguir.

6.6.1 Mistura **H-II**

A mistura **H-II** apresentou-se na forma de cristais brancos e a análise dos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT (distingue entre grupos CH_3 , CH_2 e CH) em CDCl_3 , 100 MHz, (FIGURAS 20 e 21) e também em análises complementares bidimensionais (FIGURAS 22, 23 e 24) como COSY (correlação entre H-H), HSQC (correlação entre átomos de hidrogênio e carbono ligados diretamente) e HMBC (correlação entre os átomos de hidrogênio e carbono distantes) foram comparados com os dados já existentes na literatura para esteroides (GOULART, 1992; ROSA, 2009; Sen *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2013) e permitiu sugerir que a mistura isolada é composta pelos esteroides:, **estigmasterol** (24 α -etil-colest-5,22-dienol), **sitosterol** (24 α -etil-

colest-5-enol) e **campesterol** (24 α -metil-colest-5-enol). As estruturas químicas dos compostos estão representadas na FIGURA 19.

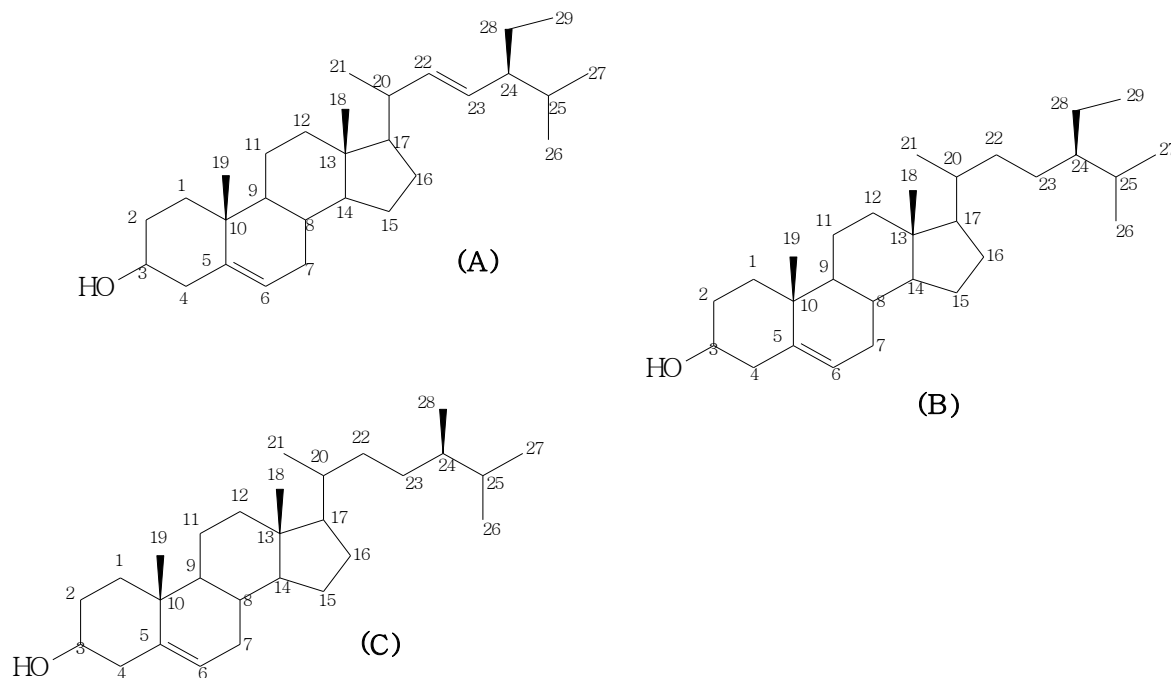


FIGURA 19. ESTRUTURA QUÍMICA: ESTIGMASTEROL (A), SITOSTEROL (B) E CAMPESTEROL (C) PRESENTES EM *L. exaltata*.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 20) mostrou sinais de carbono olefínico a $\delta 140,76$ e $121,72$ correspondentes a dupla ligação entre C-5 e C-6 dos três esteróis. Também outros dois carbonos olefínicos aparecem em $\delta 138,33$ e $129,28\text{C}$ que são deslocamentos característicos do stigmasterol referentes à C-22 e C-23. Foi observado ainda um sinal em $\delta 71,81$, atribuído ao carbono C-3 ligado a hidroxila. Os dados estão apresentados na (TABELA 9).

TABELA 9 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS PARA ^{13}C CORRESPONDENTE AO ESTIGMASTEROL, SITOSTEROL E CAMPESTEROL PRESENTES EM *Lobelia exaltata*.

C	Deslocamentos Químicos (ppm)					
	Estigmasterol		β -Sitosterol		Campesterol	
	H-II	AHMED, 2013	H-II	AHMED, 2013	H-II	ROSA, 2009
1 (CH ₂)	37,26	37,29	37,29	37,29	37,29	37,24
2 (CH ₂)	31,91	28,28	31,91	31,95	31,91	31,64
3 (CH)	71,81	71,85	71,81	71,84	71,81	71,80
4 (CH ₂)	42,32	42,36	42,32	42,36	42,32	42,27
5 (C)	140,76	140,81	140,76	140,80	140,76	140,74
6 (CH)	121,72	121,74	121,72	121,73	121,72	121,71
7 (CH ₂)	31,68	31,72	31,68	31,71	31,68	31,90
8 (CH)	31,49	34,01	31,49	31,95	31,49	31,88
9 (CH)	50,24	50,2	50,16	50,19	50,14	50,12
10 (C)	36,52	36,54	36,15	36,18	36,52	36,50
11 (CH ₂)	26,07	26,17	21,22	21,12	21,09	21,08
12 (CH ₂)	39,78	39,83	39,69	39,82	39,78	39,89
13 (C)	42,33	42,37	42,22	42,36	42,22	42,20
14 (CH)	56,87	56,82	56,77	56,81	56,06	56,75
15 (CH ₂)	24,37	24,33	24,31	24,33	24,31	24,29
16 (CH ₂)	29,15	29,23	28,25	28,26	28,25	28,24
17 (CH)	55,96	56,12	56,77	56,11	56,06	56,04
18 (CH ₃)	12,05	12,02	11,99	11,88	11,87	11,84
19 (CH ₃)	19,83	19,41	19,41	19,41	19,04	19,38
20 (CH)	40,50	40,50	36,52	36,54	36,15	36,13
21 (CH ₃)	21,09	21,13	19,04	19,07	18,99	18,97
22(CH/CH ₂)	138,33	138,33	33,95	34,00	33,72	33,69
23(CH/CH ₂)	129,28	129,0	26,07	26,16	28,93	28,91
24 (CH)	51,24	51,28	45,84	45,89	56,06	56,08
25 (CH)	45,84	45,91	29,15	29,23	29,66	29,69
26 (CH ₃)	19,41	19,42	19,83	19,83	18,71	18,76
27 (CH ₃)	19,83	19,84	18,99	18,81	19,41	19,81
28 (CH ₂)	24,31	24,34	23,07	23,12	18,26	18,24
29 (CH ₃)	12,26	12,26	12,05	12,01	-	-

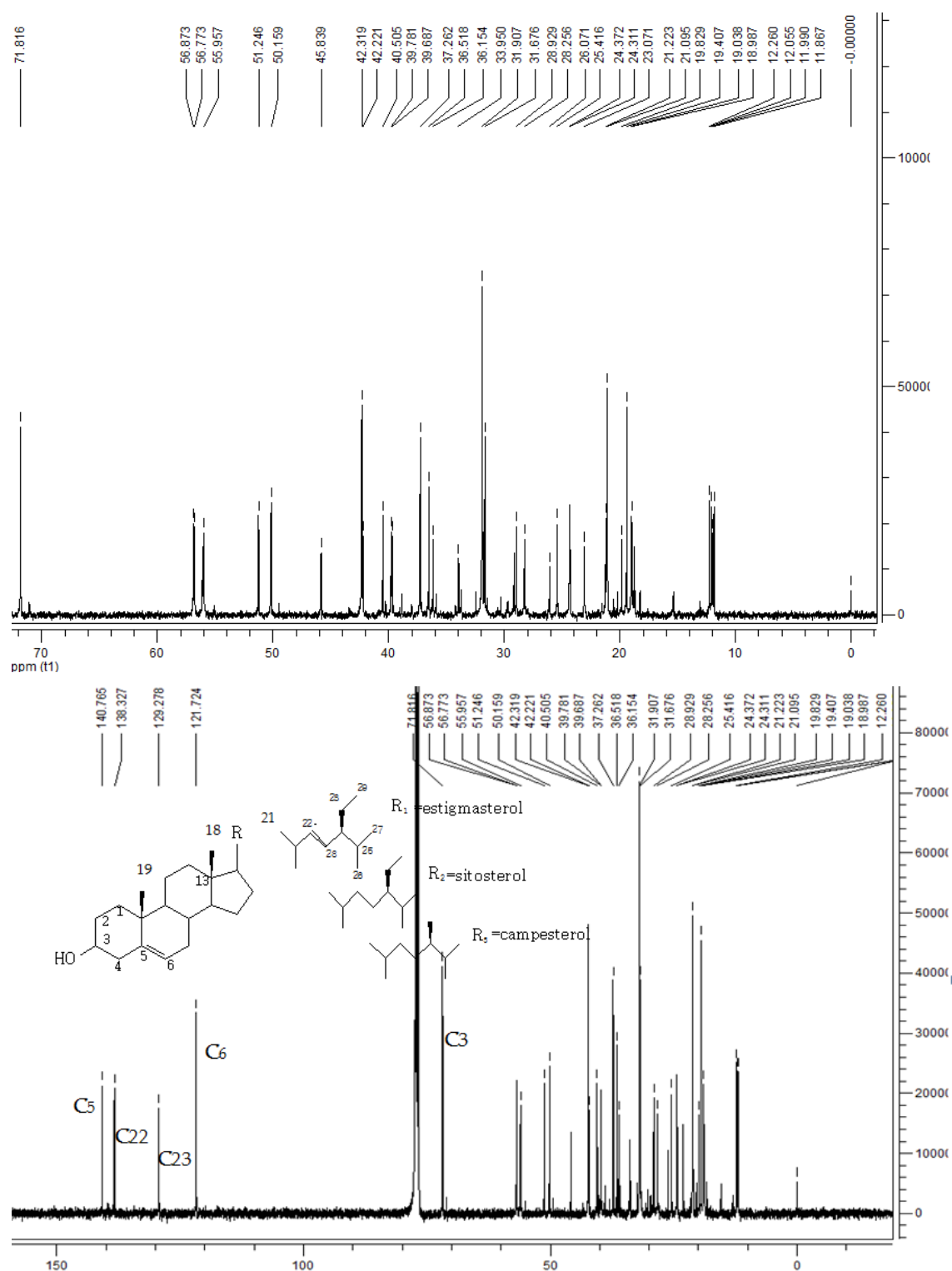


FIGURA 20. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) PARA H-II

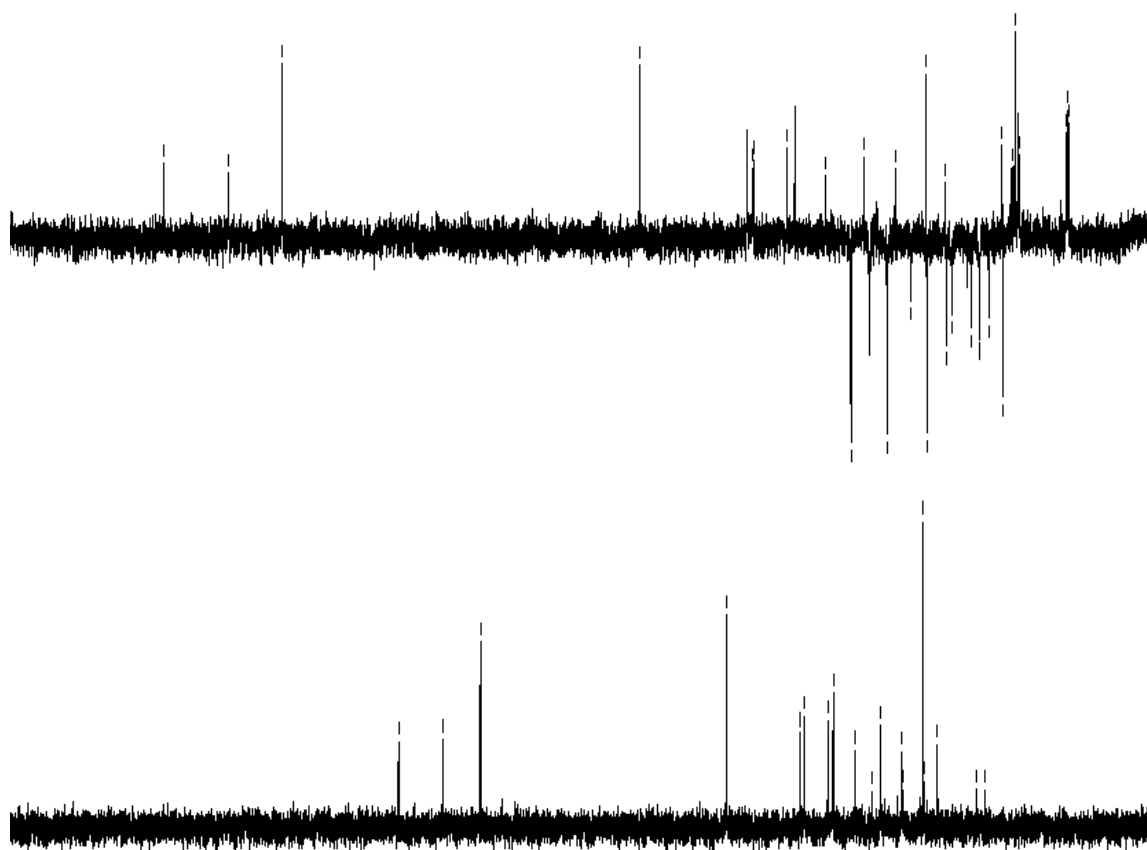


FIGURA 21. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE DEPT 135° - 90° (CDCl_3 , 100 MHz) DE H-II

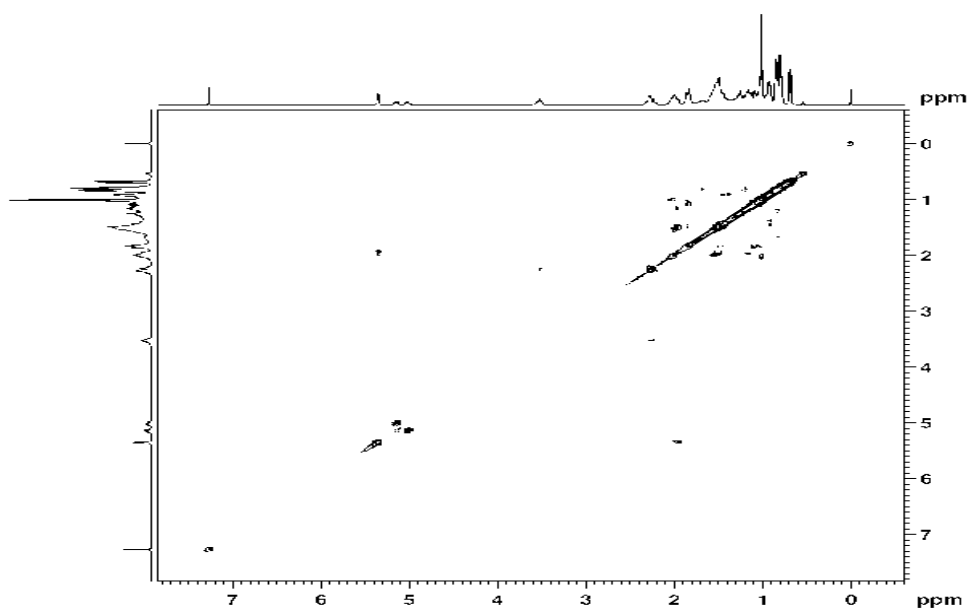


FIGURA 22. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO RMN DE $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (CDCl_3 , 400 MHz) PARA H-II.

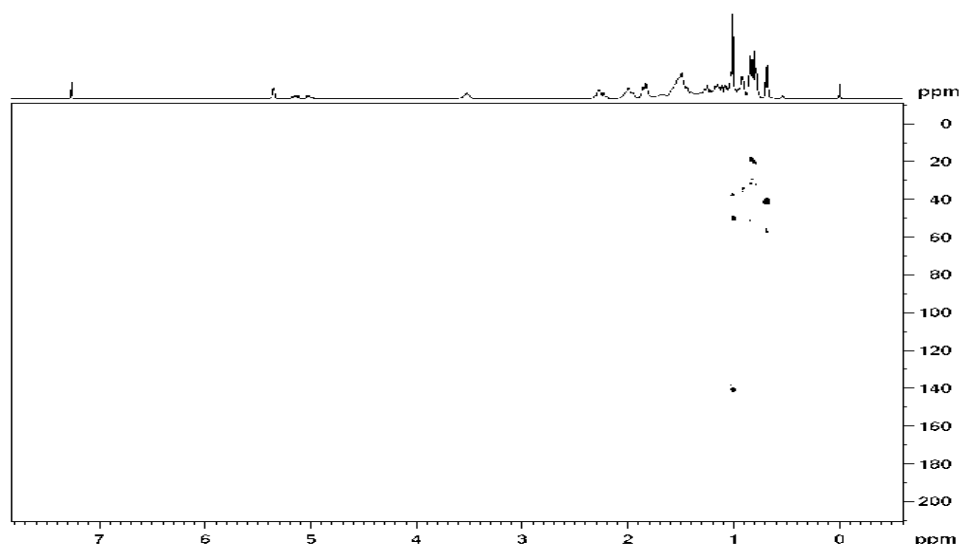


FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO RMN DE HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) PARA **H-II**.

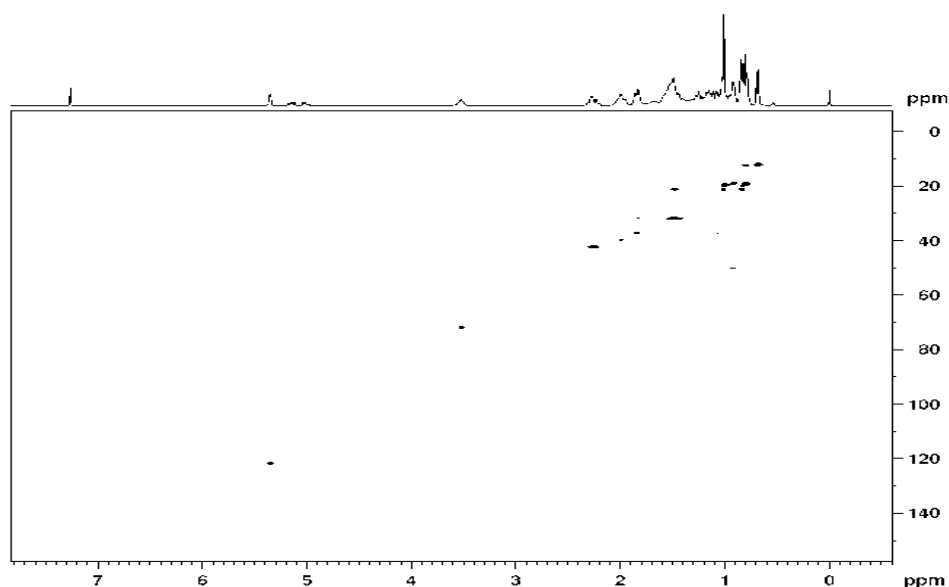


FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HSQC PARA **H-II** (400 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 25) da mistura obtida apresentou dois multipletos a δ 3,53 e 5,35 típicos de H3 e H6 de um núcleo esteroidal. Dois prótons olefínicos aparecem entre δ 4,98 (1H, dd) e 5,18(1H, dd) atribuída aos átomos de hidrogênio H22 e H23. O multipletto em δ 3,49 a 3,55 corresponde ao próton H3 (hidrogênio carbinólico). O espectro também exibe dois sinais em δ 1,00 e 0,67 referentes a H19 e H18 respectivamente. Além disso, dois dubletos a δ 0,82 e 0,80 que podem ser atribuídos a dois grupos metil de H26 e H 27 e outro

dubleto em δ 0,91 para H21. Finalmente um sinal a δ 0,84 pode ser atribuído ao próton H29. (FIGURA 26).

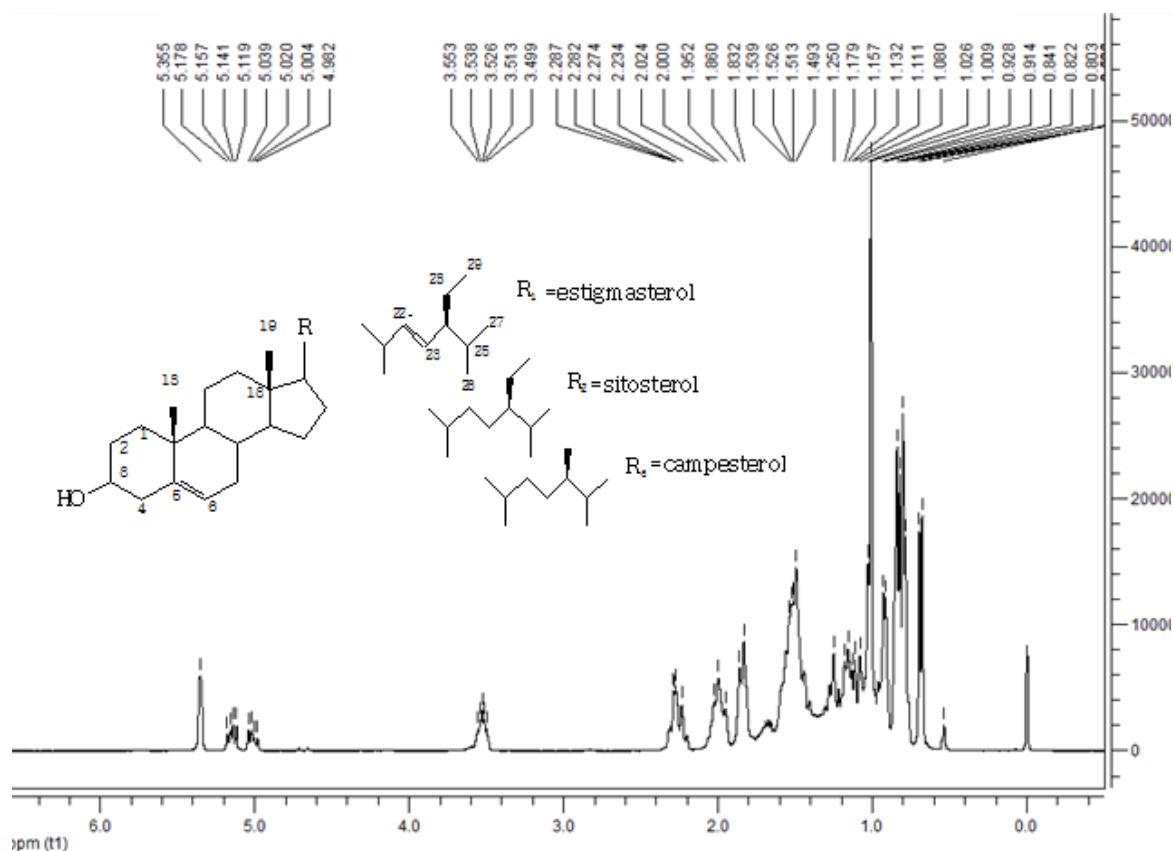


FIGURA 25. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz CDCl_3) PARA H-II.

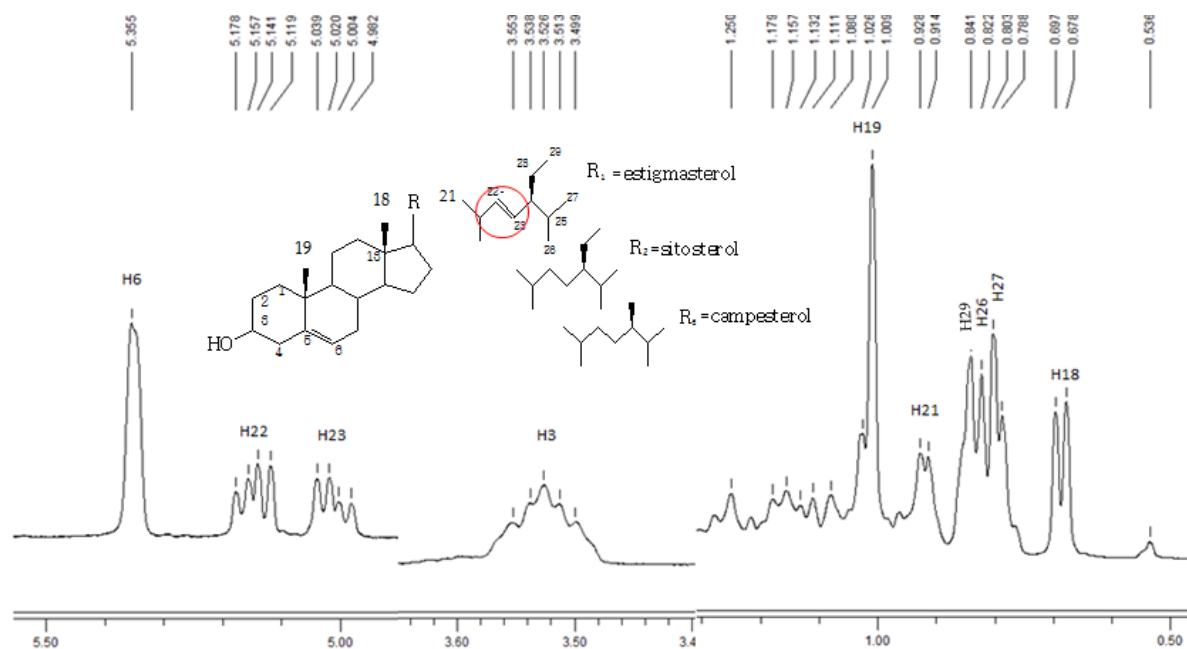


FIGURA 26 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz, CDCl_3) PARA H-II.

Há vários relatos na literatura sobre o isolamento dos fitoesteróis e também sobre suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antimicrobianas. (AHMED, 1992; CECHINEL FILHO, 2000; VIRTUOSO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2010; PARVIN *et al.*, 2011; PATIL e RAJPUT, 2012; SEN *et al.*, 2012; TESTA *et al.*, 2012; AHMED, 2013).

Sitosterol, estigmasterol e campesterol foram isolados e identificados, do extrato hexânico de *Quassia amara*, e podem ter contribuído para a sua atividade analgésica apresentada pelo extrato (TOMA *et al.*, 2003).

No gênero *Lobelia*, Zangh *et al.* (1990), isolaram e identificaram, dentre outras substâncias, o β sitosterol de *Lobelia davidii*. Kuo *et al.* (2011), caracterizaram 46 substâncias, do extrato metanólico de *Lobelia chinensis* comparando as estruturas dos metabólitos já conhecidos com os dados reportados na literatura, dentre elas, a mistura de esteroides, além de caracterizarem uma nova substância, o alcaloide, lobequina.

6.6.2 Composto **HE-II**

A substância **HE-II** obtida na fração hexano apresentou-se como um sólido branco. No espectro de RMN ^1H (CDCl_3 ; 400 MHz) (FIGURA 28) foi possível observar sinais entre δ 0,8 a 1,7, característicos de compostos alifáticos alicíclicos. Em δ 0,8 foi possível observar o deslocamento de três hidrogênios de metila e em δ 1,26 os hidrogênios CH_2 , que segundo a integração, em torno de 32. Esses deslocamentos são característicos de um hidrocarboneto de cadeia longa (*n*-alcano).

O espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 ; 100 MHz) (FIGURA 27) mostrou cinco sinais entre δ 14 - δ 32 ppm. Através da análise de espectro DEPT 135° e 90° foi possível constatar que o sinal em δ 14,3 é de um CH_3 , e os sinais entre δ 22- δ 32 são todos referentes a CH_2 .

Os dados obtidos foram comparados com os dados existentes na literatura para *n*-alcano (SIDDIQUI *et al.*, 2004; KALEGARI *et al.*, 2011) podendo sugerir que a substância é o ***n*-tetracosano** (TABELA 10).

TABELA 10 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA HE-II

Deslocamentos químicos (ppm)	
HE-II	KALEGARI <i>et al.</i> (2004)
31,8	32,1
29,9	29,8
29,6	29,5
22,9	22,8
14,3	14,1

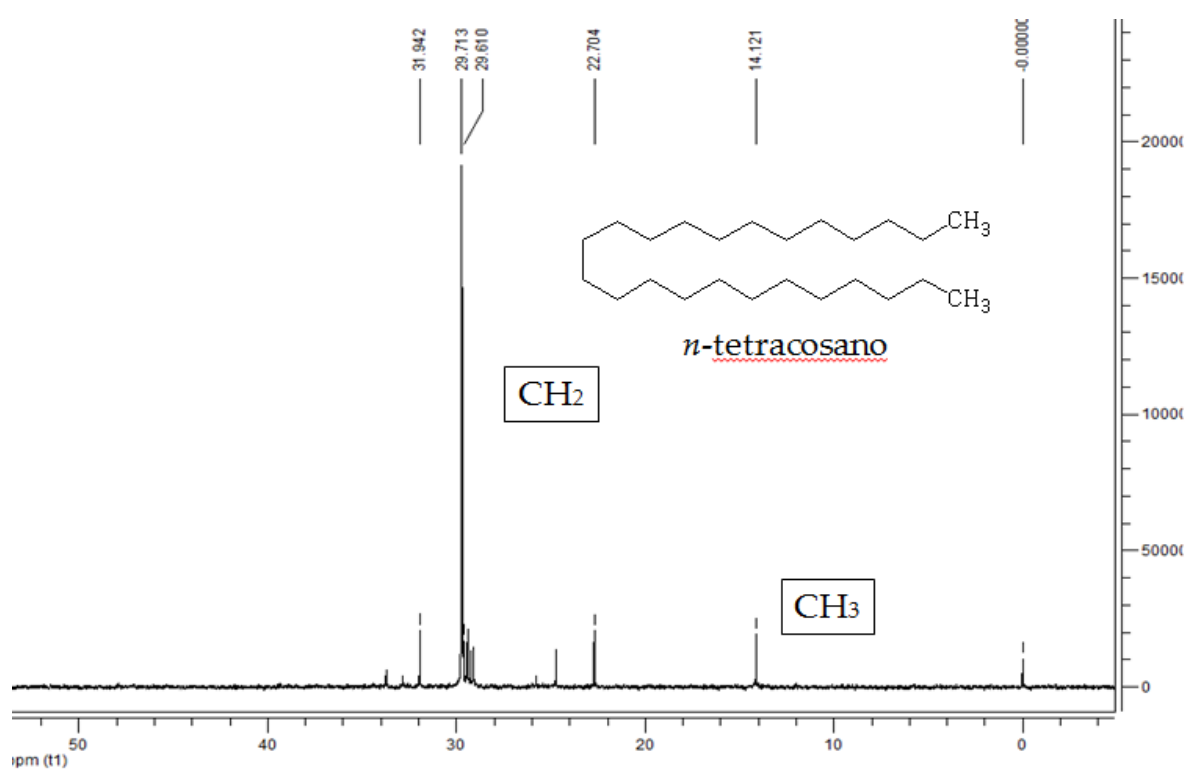


FIGURA 27. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C (100 MHZ, CDCl_3) DE HE-II

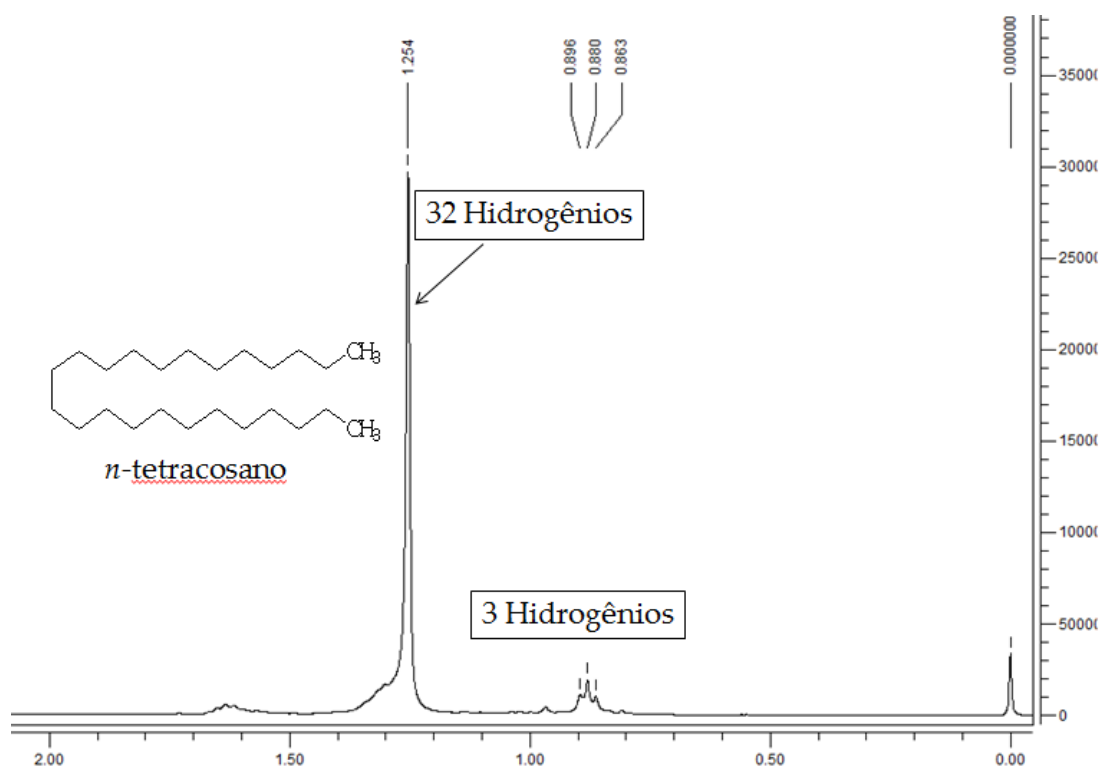


FIGURA 28. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN¹H (400 MHZ, CDCL₃) DE HE-II

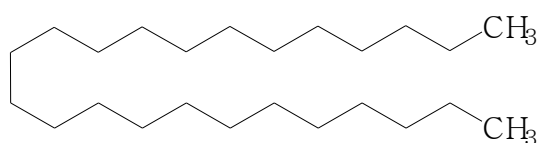


FIGURA 29 - ESTRUTURA QUÍMICA: **N-TETRACOSANO** PRESENTE EM *L.exaltata*.

O **n-tetracosano** (FIGURA 29) tem sido isolado de algumas espécies de plantas (GEETHALAKSHMI e SARADA, 2013; BATISH *et al.*, 2012; SIDDIQUI *et al.*, 2003). Uddin *et al.* (2012), verificaram a atividade citotóxica de patriscabratine, tetracosano e vários flavonoides isolados de *Acrostichum aureum* L.. O tetracosano mostrou atividade citotóxica contra células AGS, MDA-MB-231, HT-29 e células NIH-3T3, com valores IC₅₀ que variam de 128,7 a >250 µM. Patriscabratine e tetracosano exibiram um efeito apoptótico (10%) em células AGS dentro de 24 h, o que foi um aumento (20%), após 48 h, e foi comparável a, se não maior do que o controle positivo, a cicloheximida. No gênero *Lobelia* L., Joshi *et al.* (2011), encontraram o *n*-tetracosano no óleo essencial de *Lobelia*

pyramidalis Wall e os resultados mostraram moderada atividade antimicrobiana no óleo estudado.

6.6.3 Fração diclorometano

Por meio da análise da FDCM em CC obtiveram-se as subfrações L1 e L2 que foram submetidas a CCD. Após a revelação com reativo de Dragendorff, apresentaram manchas castanho-alaranjadas características de alcaloides, com Rf 0,54 e Rf 0,75, respectivamente. Florey (1990) descreve que a lobelina apresenta Rf de 0,55 quando utilizada a fase móvel metanol/ amônia (100:1,5mL), mesma fase móvel utilizada em nosso experimento. Apesar disso, não foi possível caracterizar a presença de um alcaloide específico, pela ausência do padrão na realização da análise. Com os dados obtidos podemos sugerir a presença de alcaloides na fração diclorometano e que novos procedimentos visando o isolamento dos compostos são necessários para o isolamento e identificação desses compostos.

Ainda podemos destacar que os alcaloides piperidínicos constituem um grupo de compostos com grande interesse por apresentarem várias atividades biológicas importantes, tendo a lobelina como composto majoritário de muitas espécies do gênero *Lobelia* L. (FELPIN e LEBETRON, 2004).

6.6.4 Fração acetato de etila

A fração acetato de etila (FAE) teve uma pequena porção (1 mg) submetida à análise por CLAE e o restante, (5,3 mg) foi cromatografado em CC.

A análise em CLAE com detector DAD mostrou um pico com um tempo de retenção em 12,69 e com bandas no UV em 351 nm, 267 nm e 253 nm, característicos de um flavonoide (FIGURA 30). Ao comparar o UV do composto analisado com o do padrão podemos sugerir que o flavonoide presente na fração é o diosmin (FIGURA 31).

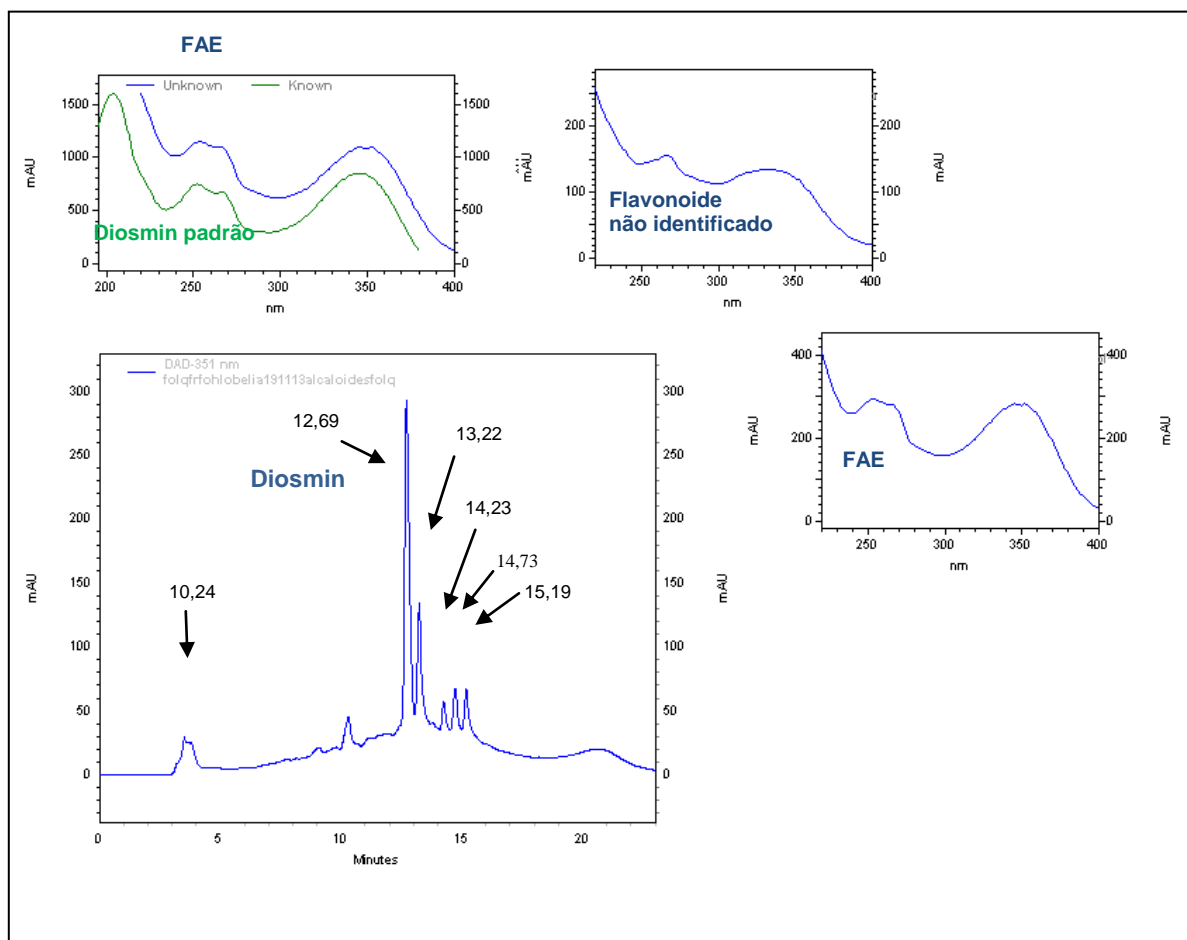


FIGURA 30. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ANÁLISE EM CLAE PARA **FAE** DE *L. exaltata*.

Outro pico com tempo de retenção um pouco mais alto, 13,22, e bandas de UV em 336 nm e 267 nm, também característicos de flavonoide, foram visualizados, porém não foi possível determinar a sua identidade. Podemos ainda visualizar 3 picos menores possivelmente de flavonoides com tempo de retenção de 14,23, 14,73 e 15,19 de alguns isômeros que também não foram identificados por essa técnica.

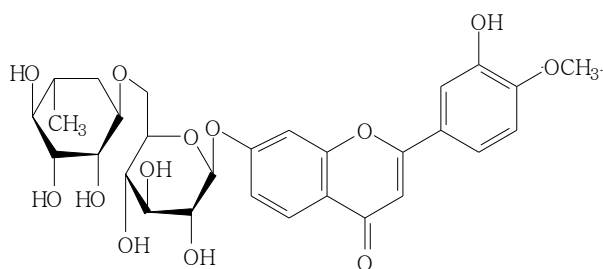


FIGURA 31. ESTRUTURA MOLECULAR DO FLAVONOIDE DIOSMIN DE *L. exaltata*.

Os flavonoides são importantes metabólitos secundários que podem ter ação contra radicais livres, moduladores de atividades enzimáticas, e inibindo a proliferação celular, bem como exercendo atividades antibiótica, antialérgica, antidiarreica, antiúlcera e anti-inflamatória (YU *et al.*, 2005). Diosmin é uma flavona, caracterizada por uma molécula de 3 anéis com grupos hidroxil ligados a uma molécula de açúcar, definido como, 7-raminoglicosídeo 5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavona (ADOUANI *et al.*, 2013) e tem uma importante aplicação farmacêutica, sendo composto ativo para algumas drogas utilizadas no tratamento do sistema circulatório. (DEL-RÍO *et al.*, 2003). Zhou *et al* (2008), separaram e identificaram diosmin e outras substâncias de *Lobelia chinensis* Lour por meio de cromatografia líquida bidimensional acoplada a espectrômetro de massa. Em outro estudo sobre componentes químicos de *L. chinensis*, Jiang *et al.* (2009), isolaram várias substâncias, entre elas o diosmin.

6.6.4.1 Composto A-II

O composto **A-II** foi obtido de FAE como um sólido branco. Os dados espectroscópicos de RMN DE ^1H , ^{13}C e DEPT e também em análises complementares, (FIGURAS 32 a 35) COSY, HSQC e HMBC (FIGURA 36 a 38) obtidos foram comparados aos existentes na literatura e levaram a propor que a amostra **A-II** é composta por um triterpeno pentacíclico, o ácido ursólico (FIGURA 39).

No espectro de RMN ^1H (FIGURA 33) foi possível observar sinais de hidrogênios referentes a sete metilas em δ 0,74 (H-25), δ 0,98 (H-24), δ 1,03 (H-26), δ 1,23 (H-27), δ 1,27 (H-23), δ 0,81 (H-29), e δ 0,91 (H-30). Foi observado um sinal em δ 3,34 (H-3), característico de hidrogênio carbinólico em triterpenos $3\beta\text{-OH}$, um sinal em δ 5,12 (H-12) típico de hidrogênio olefínico e um sinal em δ 2,11 referente ao hidrogênio alílico H-18, permitindo sugerir uma estrutura triterpênica com esqueleto ursano.

O espectro de ^{13}C associado ao espectro de DEPT (FIGURAS 34 e 35) apresentou sinais em δ 125,0 e δ 138,6 referentes aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, além dos sinais em δ 77,2 e δ 178,7 atribuídos aos carbonos carbinólico (C-

3) e carboxílico (C-28), respectivamente. As informações relacionadas à análise comparativa com dados da literatura estão apresentadas na (TABELA 11).

TABELA - 11 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C (100 MHz EM DMSO d_6) CORRESPONDENTE AO **ÁCIDO URSÓLICO** PRESENTES EM *Lobelia exaltata*.

DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm)					
C	A-II	MAHATO, 1994	C	A-II	MAHATO, 1994
1	39,3	39,3	16	24,2	24,2
2	28,0	28,0	17	47,4	47,5
3	77,2	77,2	18	52,8	52,8
4	38,8	39,7	19	39,3	39,3
5	55,2	55,2	20	38,8	38,8
6	18,4	18,4	21	30,6	30,6
7	33,1	33,1	22	36,7	36,7
8	39,6	39,5	23	28,2	28,0
9	47,2	47,4	24	16,5	16,5
10	36,9	36,9	25	15,7	15,6
11	23,3	23,3	26	17,3	17,3
12	125,0	125,0	27	23,6	23,7
13	138,6	138,6	28	178,7	178,7
14	42,0	42,1	29	17,4	17,4
15	28,2	28,0	30	21,5	21,5

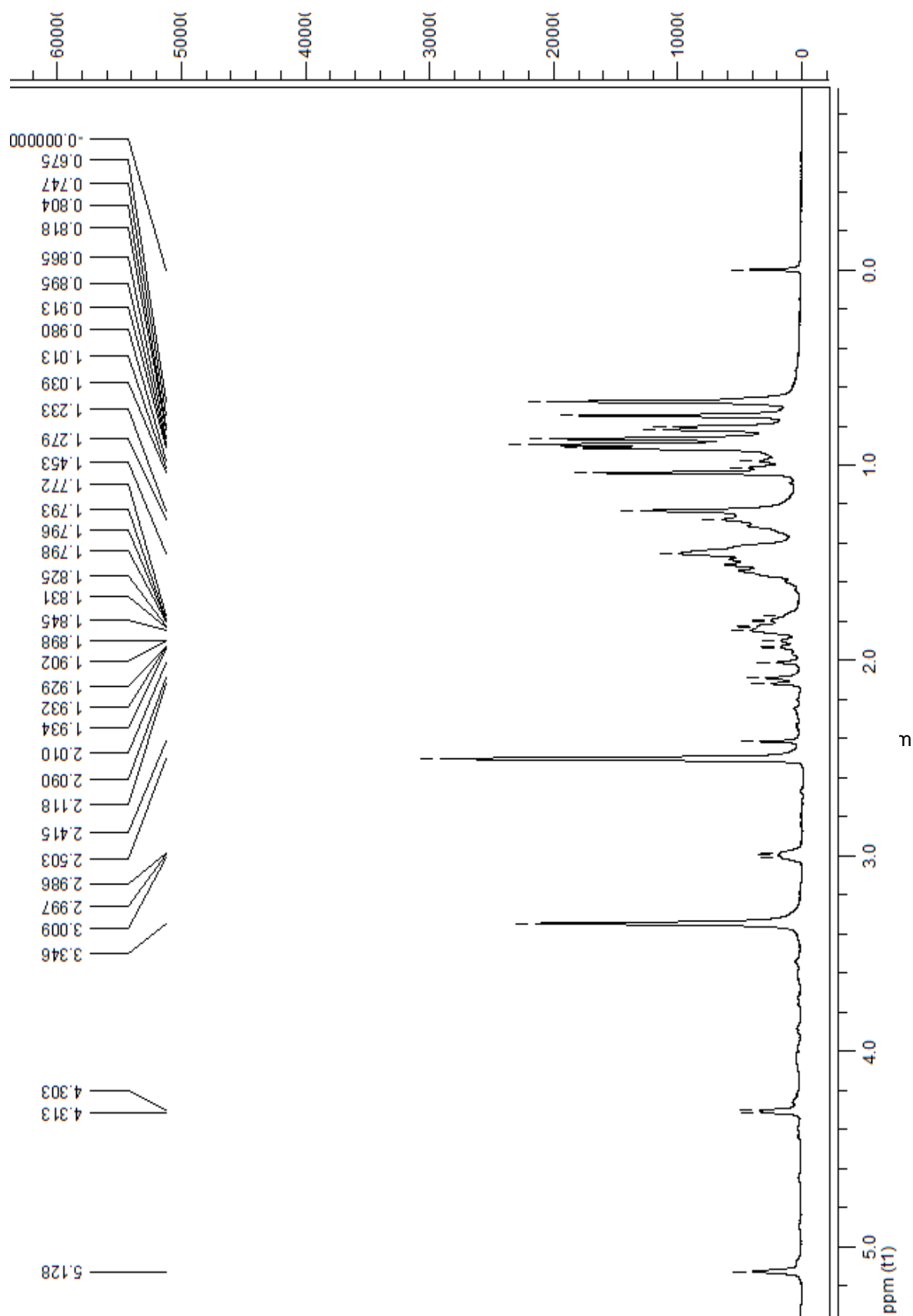


FIGURA 32 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz EM DMSO d_6) PARA A-II.

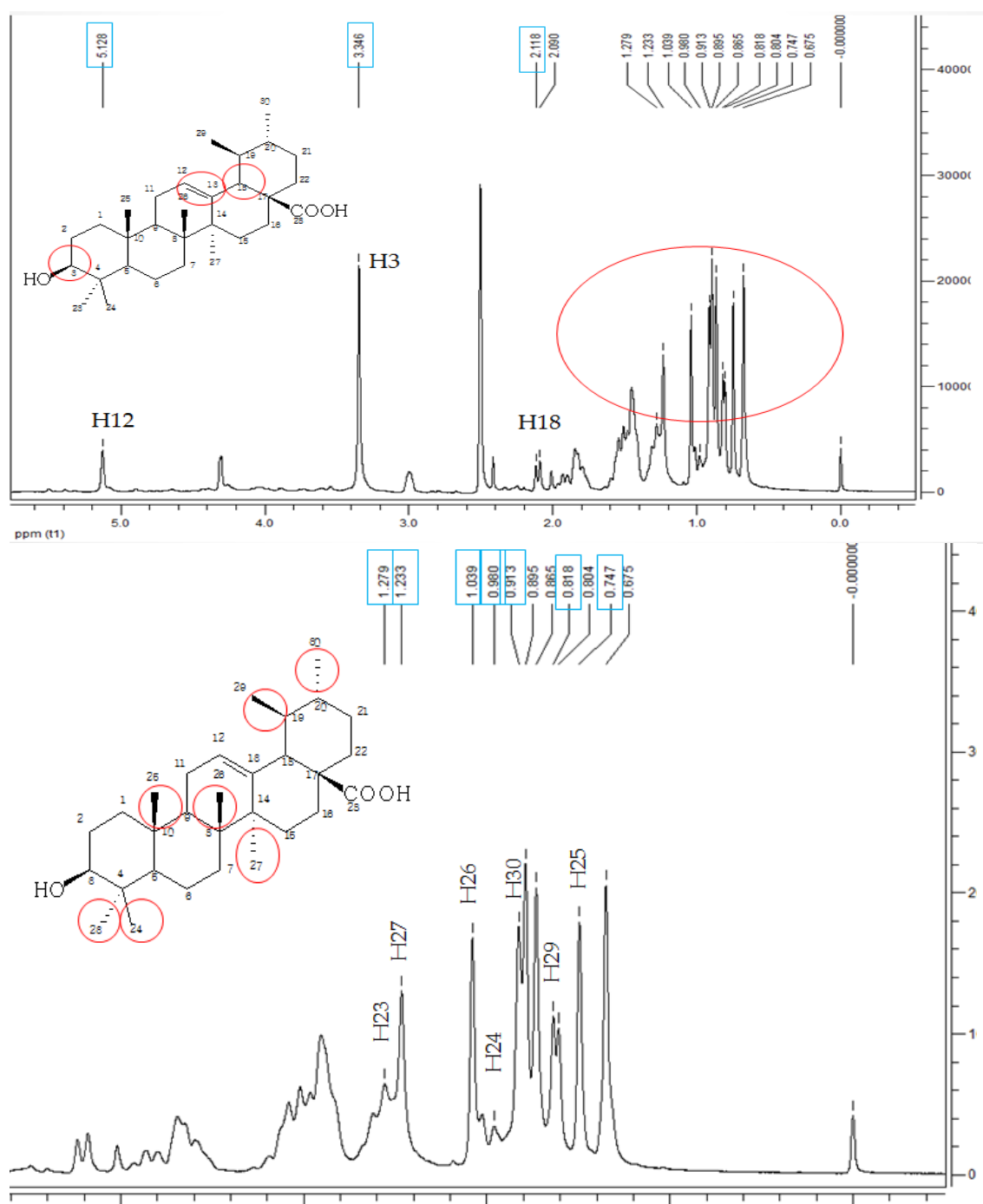


FIGURA 33. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA das EXPANSÕES DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz em $\text{DMSO}-d_6$) PARA A-II.

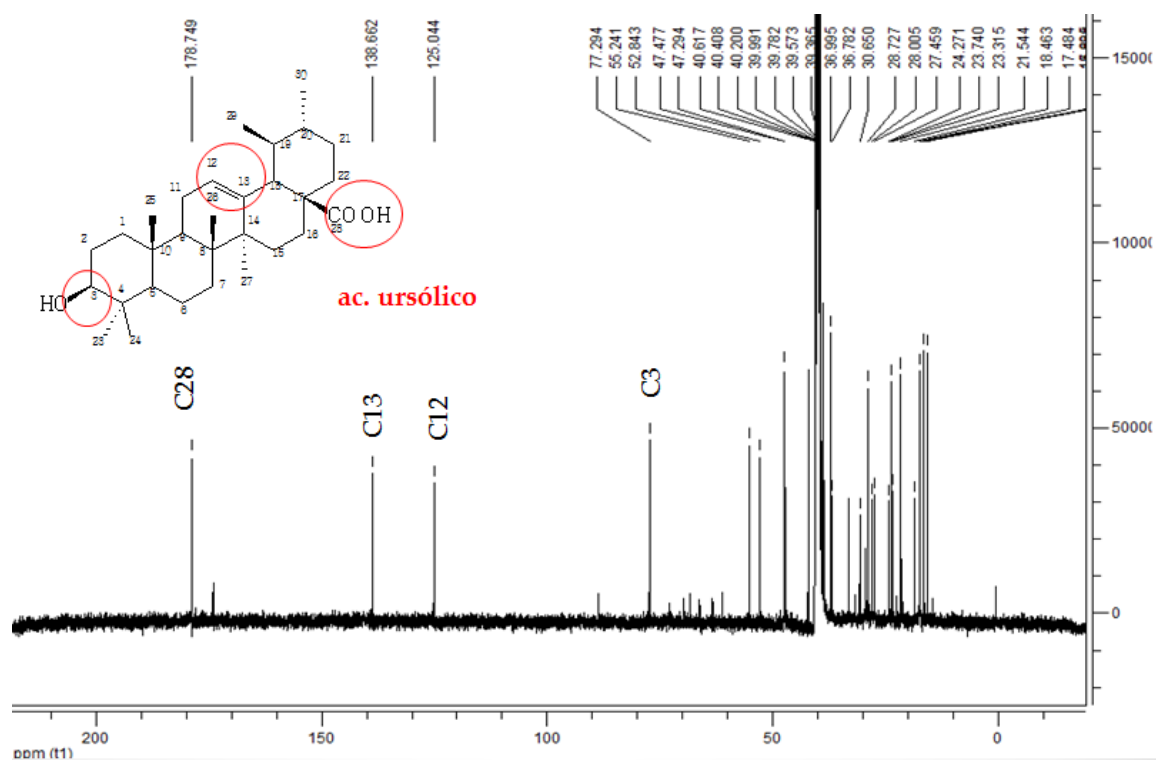


FIGURA 34. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz em $\text{DMSO}-d_6$) PARA A-II.

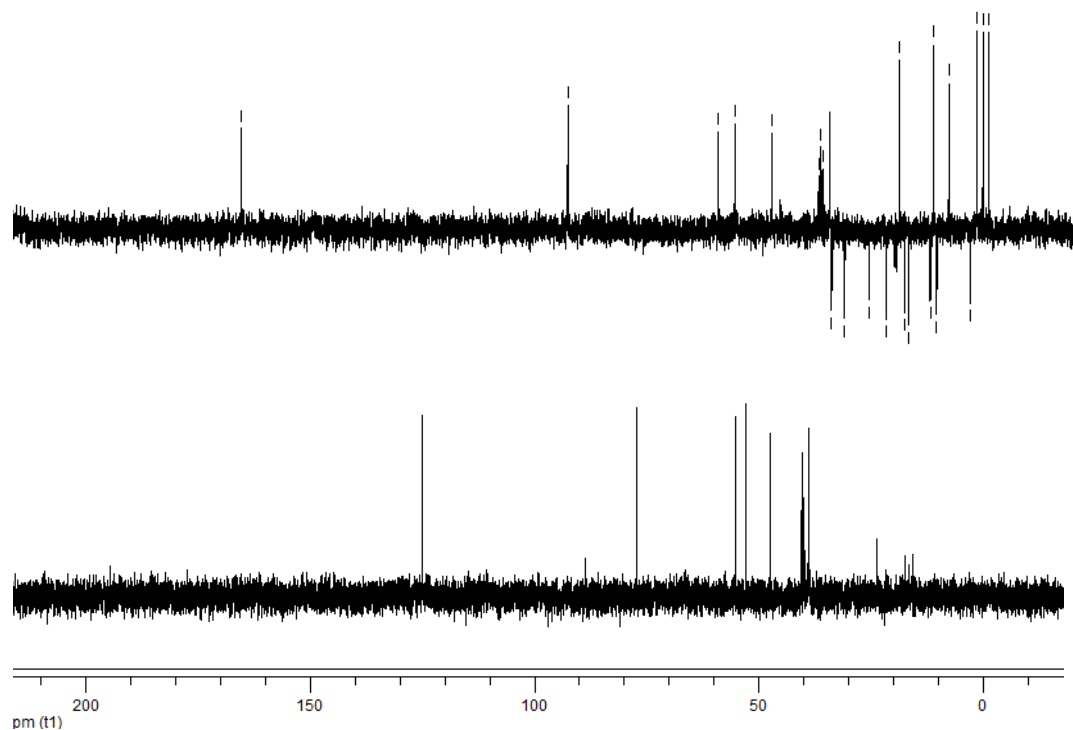


FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE DEPT 135°-90° (100 MHz em $\text{DMSO}-d_6$) PARA A-II.

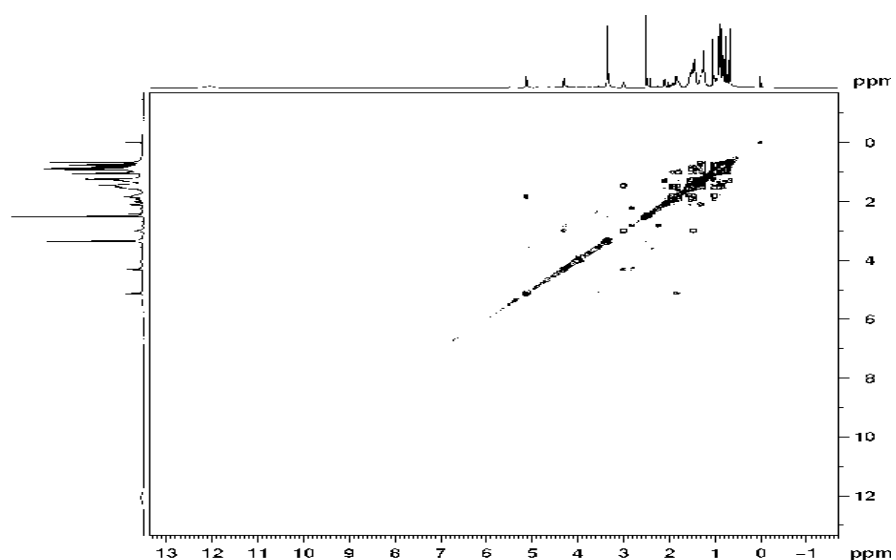


FIGURA 36. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO RMN DE $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ - COSY (CDCl_3 , 400 MHz) PARA A-II.

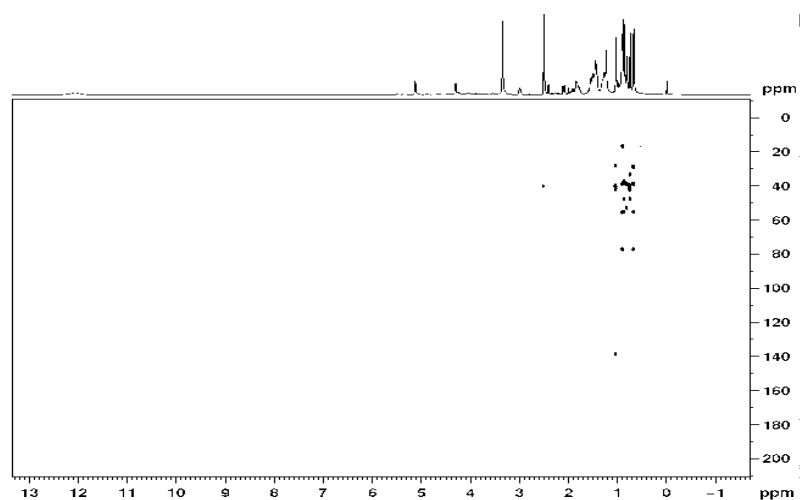


FIGURA 37. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) PARA A-II.

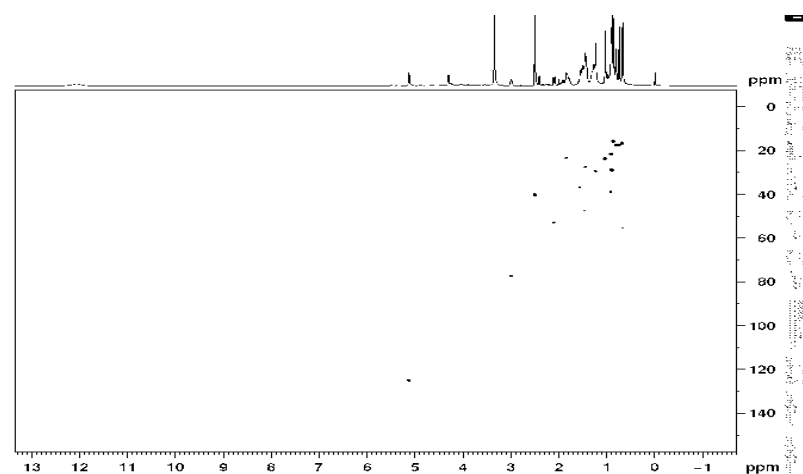


FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) PARA A-II.

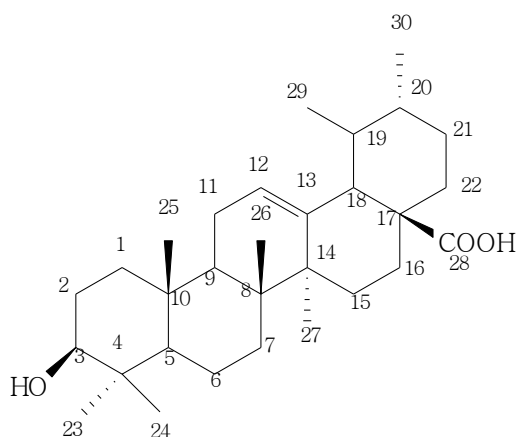


FIGURA.39 - ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO URSÓLICO

O ácido ursólico tem sido isolado de uma variedade de espécies de plantas, recentemente tem-se descoberto que possui uma série de efeitos biológicos, como sedativo, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antiulcerogênico, além de possuir baixa toxicidade para as células normais e agir sobre algumas linhas de células tumorais, incluindo carcinoma da próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma do ovário, carcinoma gástrico, melanoma e outros (MA *et al.*, 2005; SHAI, 2007; LEMES, 2011; ZANG *et al.*, 2014).

Tsai e Yin (2008) utilizaram células PC12 para examinar efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes *in vitro* do ácido oleanólico e ácido ursólico e encontraram uma potente atividade para desordens neurovegetativas.

Testa *et al.* (2012), obtiveram uma significativa atividade anti-inflamatória, por via tópica, do extrato bruto e frações *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG. (RUBIACEAE), utilizando o modelo de edema de orelha em camundongo, induzido por óleo de cróton. Alguns triterpenos isolados, dentre eles, o ácido ursólico, podem ser os responsáveis pela atividade anti-inflamatória.

6.6.4.2 Mistura **A-I**

A mistura **A-I** foi obtida de FAE e apresentou-se como um sólido ligeiramente amarelado. Os dados espectroscópicos de RMN DE ^1H (FIGURA

42), ^{13}C obtidos foram comparados aos existentes na literatura e levaram a sugerir que a amostra **A-I** é composta por triterpenos em mistura.

A análise dos dados de RMN ^{13}C (FIGURAS 40 e 41) foi possível observar sinais de carbono de dupla ligação em δ 122,1 (C12) e 143,0 (C13) e também sinais em δ 76,7 e δ 178,2 atribuídos aos carbonos carbinólico (C-3) e carboxílico (C-28). Os sinais na região de δ 15,5 a 33,1 foram atribuídos aos grupos metilas (C23 a C27, C29 e C30) assim, sugerindo a presença de um triterpeno de esqueleto oleânico. Ao comparar os dados de RMN ^{13}C de **A-I** com os do ácido ursólico proposto foi possível observar sinais em δ 124,5 (C12) e 16,8 (C29) que confirmam um triterpeno de esqueleto ursânico estava presente. A diferença entre estes triterpenos está na posição do grupo metila C29 que nos esqueletos oleânicos são conectados ao carbono C20 e, nos ursânicos, ao carbono C19; por isso a diferença de deslocamentos químicos para estes átomos. Comparando a mistura analisada com os dados da literatura propomos que **A-I** possui uma mistura de **ácido ursólico** e **ácido oleanólico** (FIGURAS 43A e 43B). Os dados de RMN ^{13}C estão apresentados na TABELA 12.

TABELA 12 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN ^{13}C PARA O ÁCIDO URSÓLICO E ÁCIDO OLEANÓICO.

C	ÁCIDO OLEANOICO	MAHATO, 1994	ÁCIDO URSÓLICO	MAHATO, 1994
1	38,0	38,5	39,3	39,3
2	27,4	27,4	28,0	28,0
3	76,7	78,7	77,2	77,2
4	38,4	38,7	38,8	39,7
5	54,7	55,2	55,2	55,2
6	17,9	18,3	18,4	18,4
7	32,7	32,6	33,1	33,1
8	38,3	39,3	39,6	39,5
9	46,9	47,6	47,2	47,4
10	36,5	37,0	36,9	36,9
11	23,2	23,1	23,3	23,3

continua

conclusão

C	ÁCIDO OLEANOICO	MAHATO, 1994	ÁCIDO URSÓLICO	MAHATO, 1994
12	121,4	122,1	125,0	125,0
13	143,7	143,4	138,6	138,6
14	41,2	41,6	42,0	42,1
15	27,4	27,7	28,2	28,0
16	22,8	23,4	24,2	24,2
17	45,6	46,6	47,4	47,5
18	41,2	41,3	52,8	52,8
19	45,6	45,8	39,3	39,3
20	30,3	30,6	38,8	38,8
21	32,7	33,8	30,6	30,6
22	32,0	32,3	36,7	36,7
23	28,2	28,1	28,2	28,0
24	15,8	15,6	16,5	16,5
25	15,0	15,3	15,7	15,6
26	16,8	16,8	17,3	17,3
27	26,9	26,0	23,6	23,7
28	178,2	181,0	178,7	178,7
29	32,7	33,1	17,4	17,4
30	23,7	23,6	21,5	21,5

DMSO_d₆, 100MHZ.

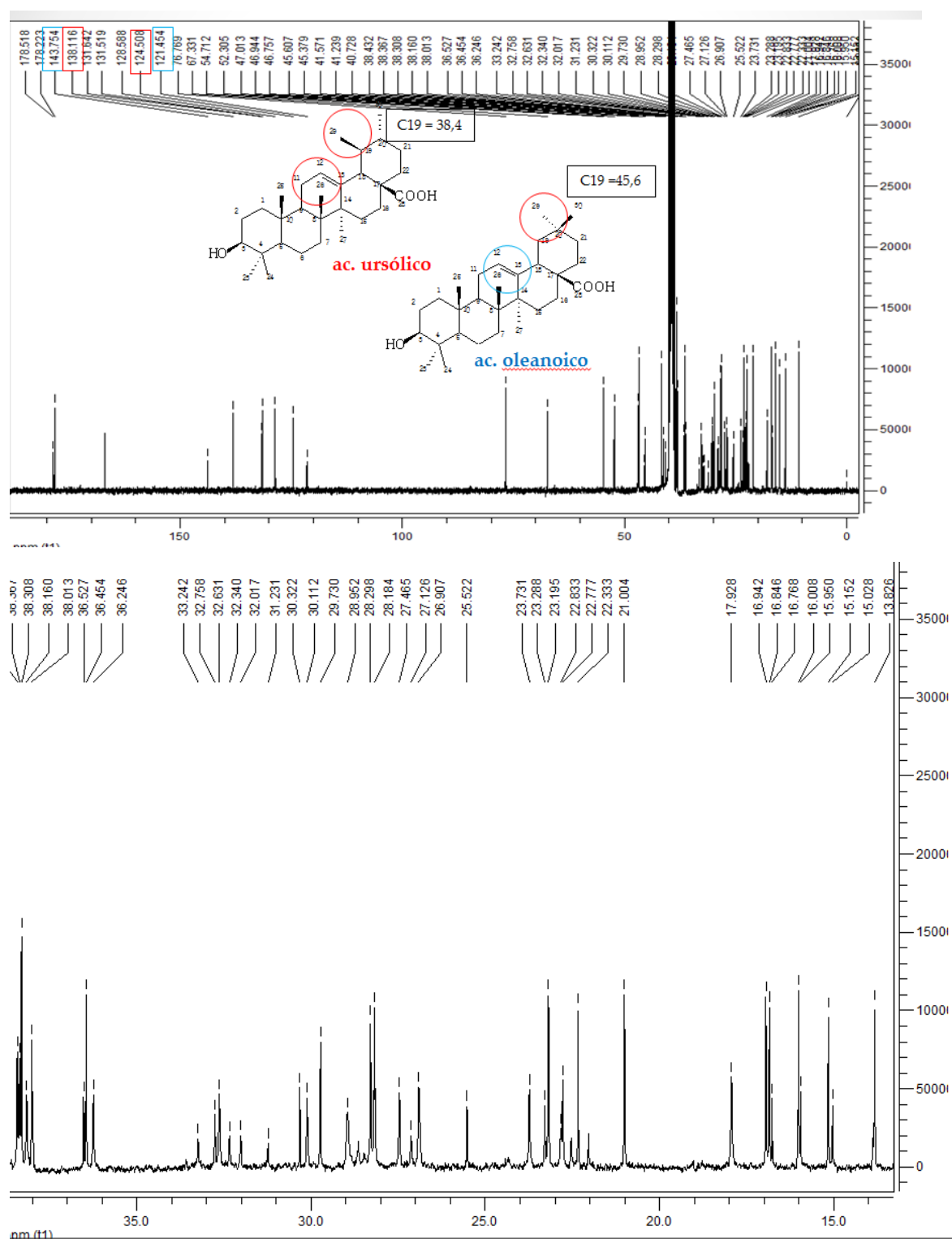


FIGURA 40. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) PARA A-I.

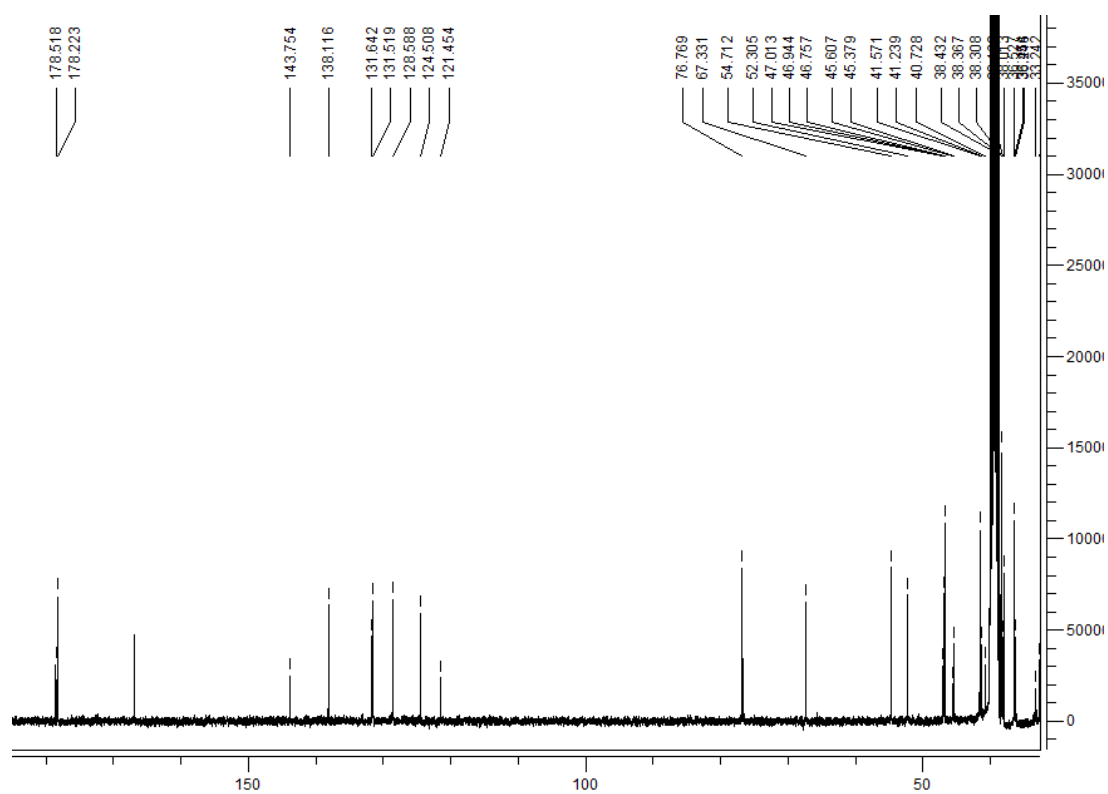


FIGURA 41. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) PARA A-I.

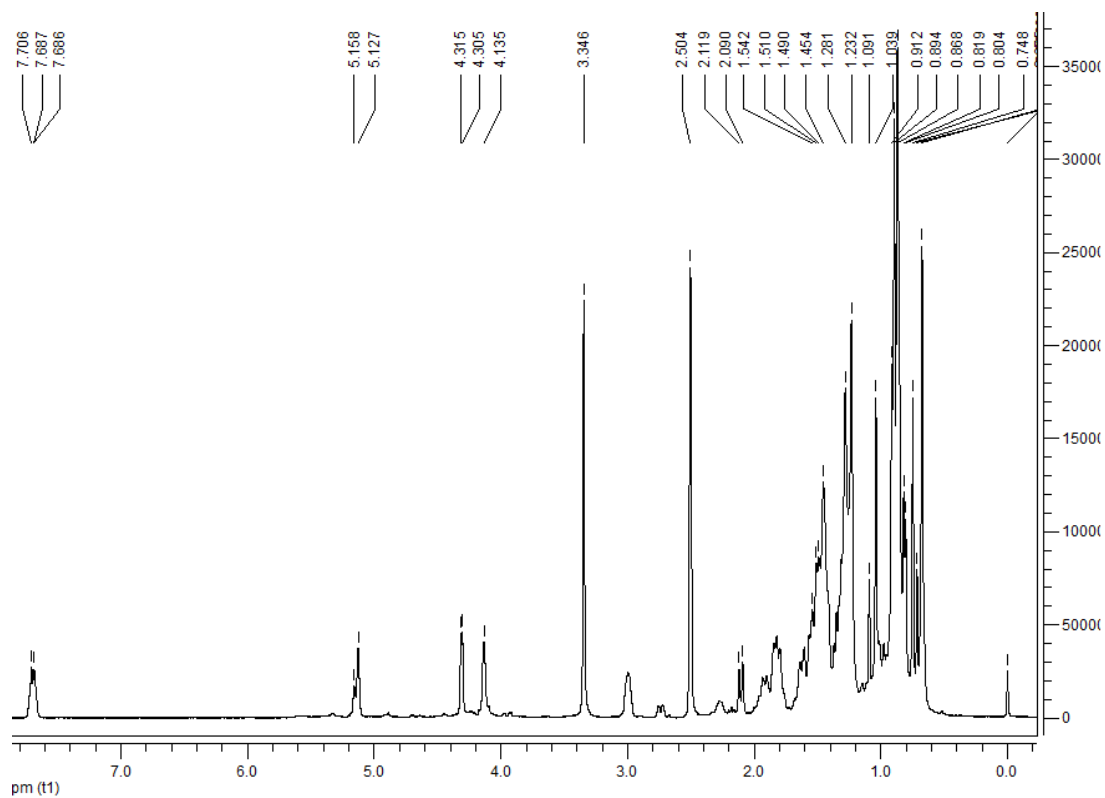


FIGURA 42. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) PARA A-I.

O ácido oleanoico, assim como o ácido ursólico, é um triterpeno que apresenta propriedades anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica e antileishmania (KUETE *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2006; TORRES-SANTOS *et al.*, 2004; LIU, 1995). Dharmappa *et al.* (2009) avaliaram o efeito do ácido oleanóico em sPLA2, uma importante enzima envolvida em reações inflamatórias, onde houve inibição da atividade hemolítica indireta e de edema de pata de rato induzida por sPLA2.

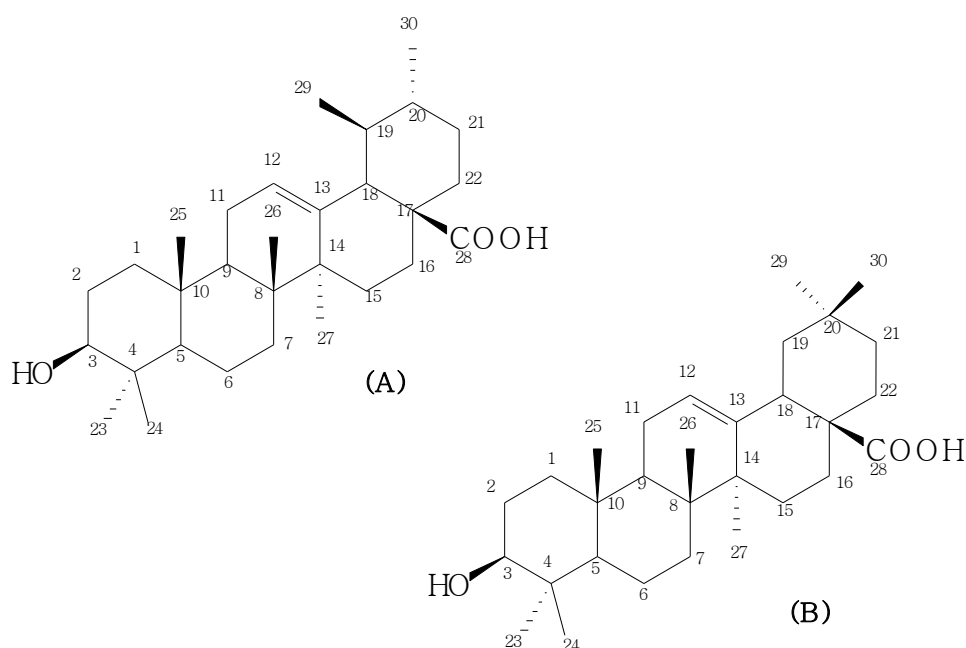


FIGURA 43 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO URSÓLICO (A) E ÁCIDO OLEANOICO (B).

6.7 ANÁLISE DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.7.1 Atividade Antioxidante

O perfil da atividade antioxidante dos extratos e frações foi determinado através das metodologias de: formação do complexo fosfomolibdênio, redução do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) e determinação da taxa de peroxidação lipídica através da reação com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

6.7.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

O ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, ocorrendo a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695 nm, e a atividade antioxidante relativa (AAR%) foi determinada de acordo com o padrão vitamina C (valor considerado como 100% de formação do complexo), para este teste, todas as amostras e padrões foram utilizados na concentração de 200 µg/mL. Os resultados encontrados são mostrados na TABELA 13.

TABELA 13 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)	Atividade Antioxidante em relação ao ácido ascórbico (%)
Extrato Bruto	18,1	61,2
Fração Hexano	17,5	67,6
Fração Diclorometano	2,1	13,0
Fração Acetato de Etila	27,4	93,5
Fração Hidroalcoólica	1,9	10,8

De acordo com os dados obtidos nesta análise foi possível concluir que dentre as amostras testadas, a fração FAE apresentou um melhor resultado com atividade antioxidante de 27,4% em relação à vitamina C e de 93,5% quando comparado com o padrão rutina que é considerado um flavonoide de ação antioxidante conhecida. Este resultado era esperado devido a maior concentração de compostos fenólicos, que tem potencial antioxidante, nessa fração. Os resultados podem ser melhor visualizados pelo GRÁFICO 1.

Atividade Antioxidante Relativa (AAR) a Rutina e Vitamina C

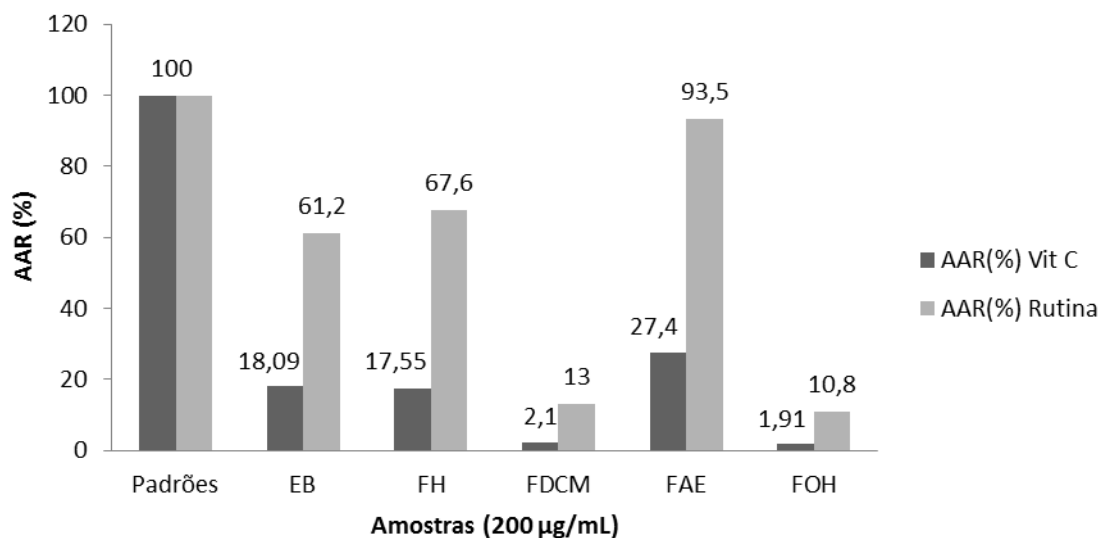


GRÁFICO 1 –. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA EM RELAÇÃO AO PADRÃO VITAMINA C E RUTINA. **EB**: EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO; **FH**: FRAÇÃO HEXANO; **FDCM**: FRAÇÃO DICLOROMETANO; **FAE**: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA E **FOH**: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA.

6.7.1.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

Um dos métodos mais utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas de plantas consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil - DPPH, que é capaz de aceitar um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, dessa forma, sofrer redução na presença de um antioxidante. Na forma de radical o DPPH possui uma coloração púrpura intensa que absorve a 518 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R\cdot$), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (MOLYNEUX, 2004). Para a avaliação da atividade antioxidante foram testadas cinco concentrações de cada amostra e a porcentagem de inibição do DPPH foi

calculada a partir da absorbância obtida para cada concentração e por regressão linear foi possível calcular o IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Cada amostra foi comparada com os padrões de vitamina C e rutina.

Os gráficos representam as curvas obtidas para extrato e frações obtidos das partes aéreas de *L. exaltata*.

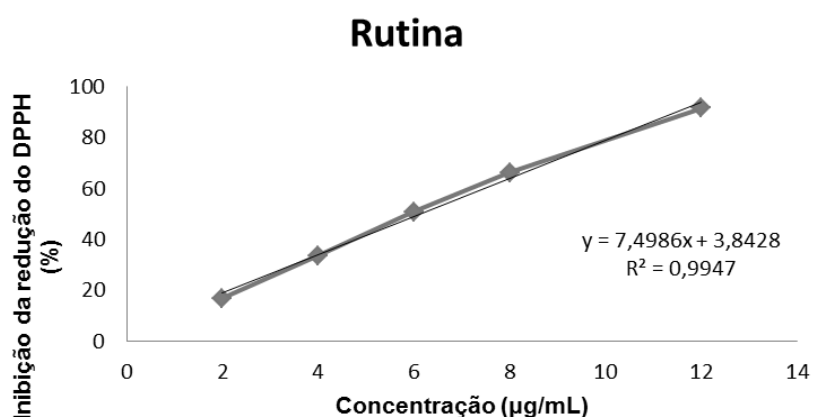


GRÁFICO 2 - CURVA DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH.

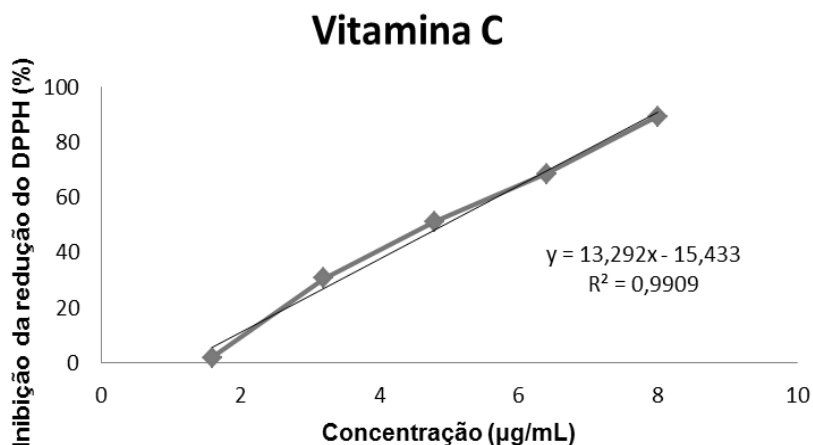


GRÁFICO 3 - CURVA DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH.

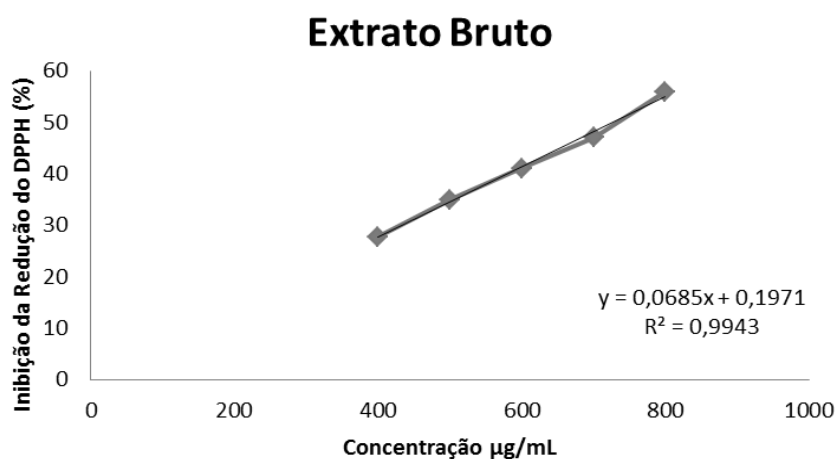


GRÁFICO 4 - CURVA DO EXTRATO BRUTO PELA REDUÇÃO DO DPPH.

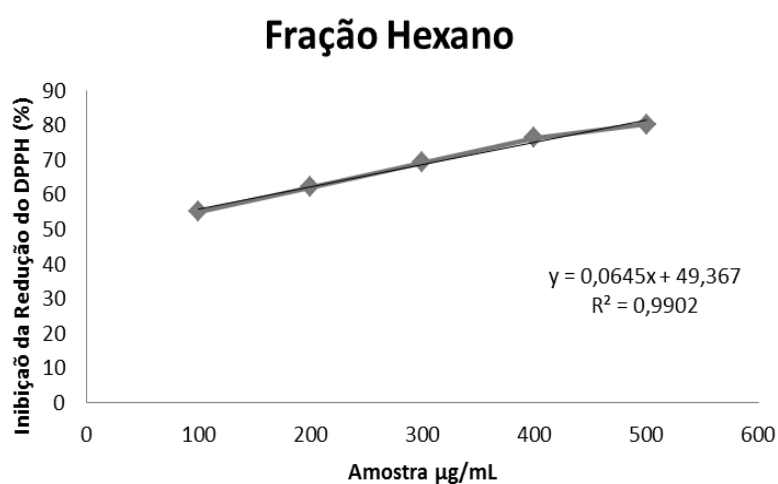


GRÁFICO 5 - CURVA DA FRAÇÃO HEXANO PELA REDUÇÃO DO DPPH.

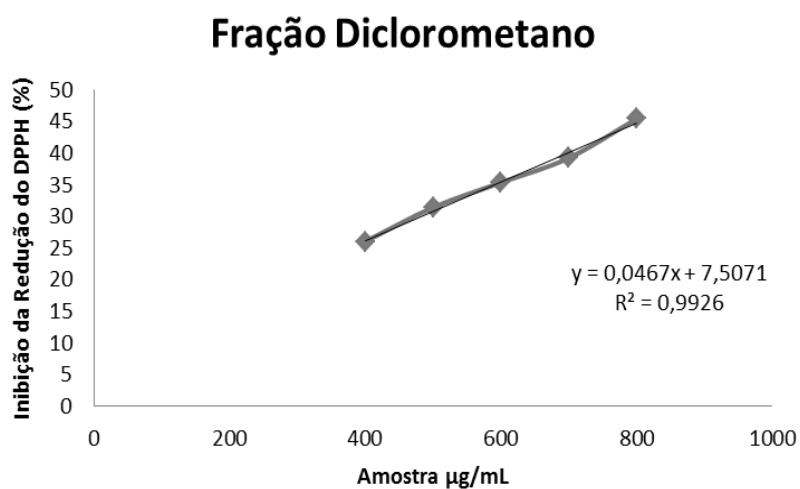


GRÁFICO 6 - CURVA DA FRAÇÃO DICLOROMETANO PELA REDUÇÃO DO DPPH.

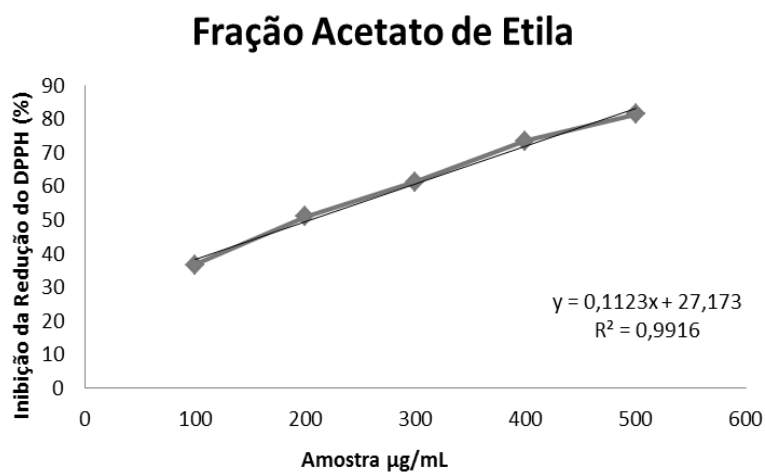


GRÁFICO 7 - CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA PELA REDUÇÃO DO DPPH.

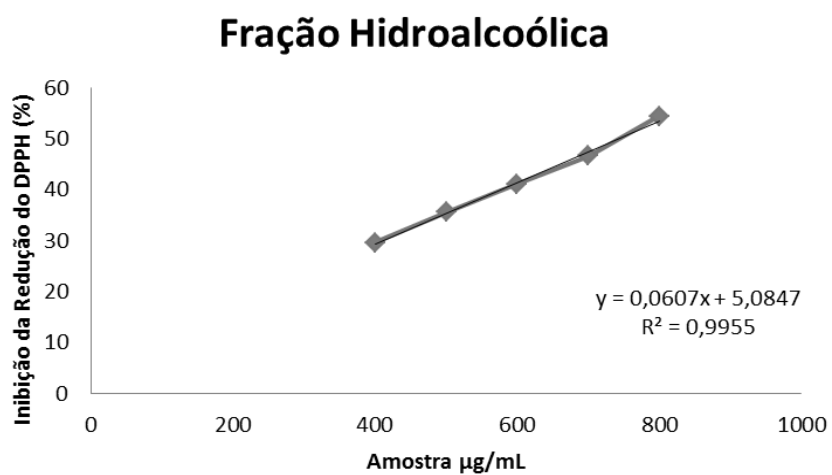


GRÁFICO 8 - CURVA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA PELA REDUÇÃO DO DPPH.

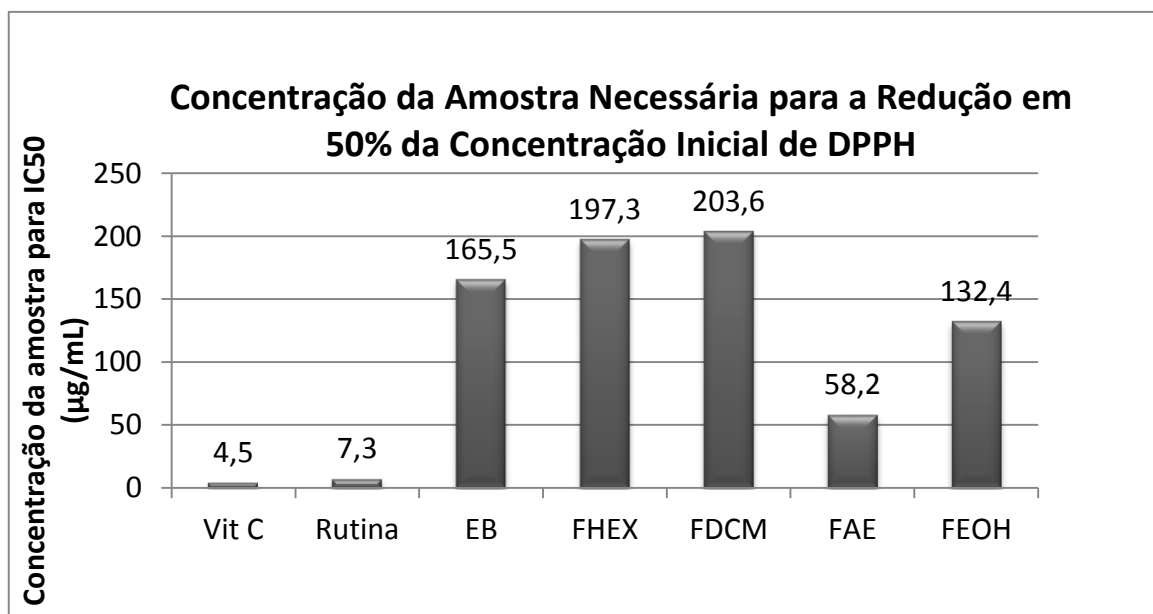


GRÁFICO 9 – IC₅₀: CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA QUE REDUZ 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH. (EB: EXTRATO BRUTO; FHEX: FRAÇÃO HEXANO; FDCM: FRAÇÃO DICLOMETANO; FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; FEOH: FRAÇÃO ETANÓLICA).

Comparando os valores de IC₅₀ obtidos para as amostras e padrões analisados (vitamina C com IC₅₀=4,5; rutina com IC₅₀=7,3) podemos concluir que a fração acetato de etila apresentou o melhor desempenho (IC₅₀=58,2). As frações de menor polaridade apresentaram os menores potenciais antioxidantes: fração hexano (IC₅₀=197,3) e fração diclorometano (IC₅₀=203,6), ou seja, maiores quantidades de amostra são necessárias para obtenção da atividade desejada.

6.7.1.3 Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método de determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico é utilizado para verificar a capacidade das amostras testadas em inibir a peroxidação lipídica induzida por um agente oxidante. Fundamenta-se na medida da lipoperoxidação pela produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), que forma entre outros compostos o malondialdeído (MDA), que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma um cromóforo rosa que pode ser medido em

espectrofotômetro de placa a 532 nm. Dessa forma, é possível avaliar o efeito do estresse oxidativo induzido e a proteção da lipoperoxidação conferida pelas substâncias antioxidantes que possam estar presentes nas amostras analisadas. (MORAIS *et al.*, 2006).)

Os resultados obtidos estão demonstrados no GRÁFICO 10. Neste ensaio, as amostras de caráter mais lipofílico apresentaram melhor atividade. As frações hexano e diclorometano demonstraram uma melhor capacidade antioxidante quando comparadas as frações acetato de etila e hidroalcoólica, porém são inferiores ao padrão utilizado, indicando possivelmente que o desempenho melhor da fração hexano e diclorometano seja atribuído às características majoritariamente lipofílicas dessas amostras.

A hidrofília dos compostos deve ser considerada em ensaios de peroxidação lipídica, visto que a baixa polaridade e alto coeficiente de partição de compostos lipofílicos permite uma melhor interação com a matriz lipídica promovendo proteção ao dano (SCHROETER *et al.*, 2000).

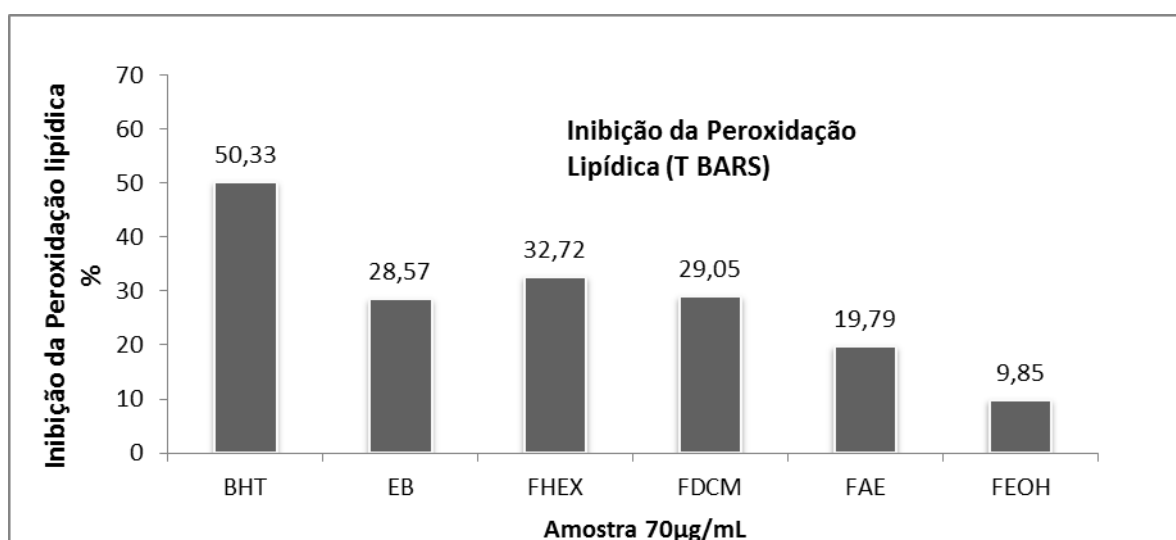


GRÁFICO 10 - INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. (BHT: HIDROXIBUTILTOLUENO; EB: EXTRATO BRUTO; FHEX: FRAÇÃO HEXANO; FDCM: FRAÇÃO DICLOROMETANO; FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; FEOH: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA).

Os testes antioxidantes realizados neste estudo, complexo fosfomolibdênio, o radical livre DPPH e TBARS, mostraram diferentes resultados. Isto pode ser

explicado pelos diferentes mecanismos de reações envolvidos entre os compostos com características antioxidantes presentes nestes materiais e os reagentes destas técnicas, apresentando maior ou menor afinidade (SÀNCHEZ e MORENO, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007)

De maneira geral, as amostras de *L. exaltata* demonstraram uma baixa capacidade antioxidante frente aos métodos utilizados.

6.7.2 Atividade Antimicrobiana

6.7.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

No teste de CIM, após a inoculação dos microrganismos em meio de cultura com amostras em diferentes diluições (TABELA 14), verificou-se o primeiro poço onde não houve crescimento bacteriano.

A revelação dos resultados foi realizada utilizando um corante indicador de oxi-redução, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTZ). As células vivas, através de enzimas específicas, reduzem o TTZ, inicialmente incolor, originando o formazano, que se acumula no interior das células, resultando na alteração da coloração do meio para rósea (BELOTTI, BARROS e NERO, 1999).

Holetz *et al.* (2002) relatam em seus estudos que os extratos com uma concentração inibitória menor que 100 µg/mL tem uma boa atividade antibacteriana, se for entre 100-500 µg/mL é moderada, de 500-1000 µg/mL é fraca e acima de 1000 µg/mL considera-se inativo.

Um dos problemas associados ao experimento foi baixa solubilidade das frações e substâncias em meio aquoso. O extrato e frações foram dissolvidos em metanol com agitação. Para o ácido ursólico foi utilizado metanol com agitação e aquecimento e para a mistura de esteroides, tween 80 a 4% (SARAIVA *et al.*, 2012).

TABELA 14 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE *Lobelia exaltata*.

Amostras	Concentração inibitória mínima (µg/mL)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EB	250	500	-	-	1000
FHE	250	250	500	-	1000
FDCM	1000	-	-	-	-
FAE	250	500	500	-	1000
FEOH	1000	-	-	-	-
Acido ursólico	125	250	500	-	1000
Tetracosano	-	-	-	-	-
Esteroides	62,5	250	1000	-	-

EB: EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO, FH: FRAÇÃO HEXANO, FDM: FRAÇÃO DICLOROMETANO, FAE: FRAÇÃO ACEATO DE ETILA; FEOH: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA, (-): INATIVO.

O extrato bruto apresentou uma moderada atividade antibacteriana contra *S. aureus*, fraca frente a *E. coli* e *C. albicans* e foi inativo frente aos demais microrganismos. Para a fração hexano ocorreu inibição para *S. aureus* e *E. coli* na diluição 1:3 (250 µg/mL), e para *E. faecalis* de 1:2 (500 µg/mL). A fração acetato de etila, também apresentou atividade moderada para *S. aureus* na diluição 1:3 (250 µg/mL), e para *E. coli* e *E. faecalis* de 1:2 (500 µg/mL). O ácido ursólico foi ativo contra *S. aureus* na diluição 1:4 (125 µg/mL), *E. coli* na diluição 1:3 (250 µg/mL), para *E. faecalis* na diluição 1:2 (500 µg/mL) e *C. albicans* na diluição 1:1 1000 µg/mL). A mistura de esteroides (sitosterol, estigmasterol e campesterol) apresentou uma boa atividade contra *S. aureus* na diluição 1:5 (62,5 µg/mL), e moderada para *E. coli* na diluição 1:3 (250 µg/mL). O tetracosano, não apresentou atividade frente a nenhum dos microrganismos testados e o crescimento da *P. aeruginosa* não foi inibido por nenhum dos extratos e substâncias testadas.

Shai (2007), em seu trabalho sobre caracterização de compostos de *Curtisia dentata* (Cornaceae) testou o ácido ursólico contra as bactérias *S. aureus* (62,5 µg/mL), *E. coli* (250 µg/mL), *P. aeruginosa* (4,0 µg/mL) e *E. faecalis* (47µg/mL), os resultados corroboram com os valores encontrados em nosso estudo, porém difere quanto a atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* que em nosso estudo não apresentou-se ativo. Mallavadhani *et al.* (2004), isolaram

ácido ursólico de folhas de *Diospyros melanoxylon* e testaram contra uma série de bactérias Gram positivas e Gram negativas e encontraram alta atividade contra *Pseudomonas syringae* e moderada atividade contra *Bacillus sphaericus*.

Patil e Rayput (2012), isolaram β -caroteno e stigmasterol do extrato de éter de petróleo de folhas de *Butea monosperma* Lam. Kuntze verificou a atividade antibacteriana e antifúngica dos isolados pelo método de disco difusão e obtiveram uma significativa atividade para as duas substâncias quando comparadas aos padrões utilizados. Os micorganismos utilizados nos testes foram *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. niger* e *C. albicans*.

Em outro estudo, Sen *et al.* (2012), determinaram a atividade antimicrobiana do β -sitosterol isolado de *Momordica charantia* L. pelo método de difusão em ágar. A atividade antimicrobiana ficou entre 10 mm a 14 mm para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Em comparação com o padrão gentamicina (20 μ g/mL), o β -sitosterol (20 μ g/mL) teve atividade antimicrobiana equivalente ao padrão.

6.8 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

6.8.1 - Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL₅₀) (MEYER *et al.*, 1982). As amostras foram consideradas tóxicas quando os valores de DL₅₀ foram menores que 1000 μ g/mL (MEYER *et al.*, 1982). Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina nas mesmas concentrações das amostras.

Neste ensaio, nenhuma amostra testada de *L. exaltata* apresentou toxicidade frente aos microcrustáceos. Os resultados estão expressos na TABELA 15.

TABELA 15. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*.

Amostra	Mortalidade / Concentração		
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)
Extrato bruto	0	1	1
Fração hexano	0	1	2
Fração diclorometano	0	0	2
Fração acetato de etila	0	1	2
Fração hidroalcoólica	0	0	0
Fração hidroalcoólica precipitado	0	0	0
Sulfato de quinidina	1	5	9

O estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico apresentado neste estudo contribuíram para o melhor conhecimento de *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae), revelando importantes substâncias e atividades biológicas, porém, por se tratar de um vegetal com uma abundante composição química, ainda restam muitos compostos para serem identificados e testados com relação as suas propriedades.

7 CONCLUSÃO

O estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico realizado com as partes aérea de *Lobelia exaltata* Pohl (Campanulaceae) permitiram concluir que:

a) Estudo Morfoanatômico:

- a espécie estudada apresentou folhas sésseis e lanceoladas, ausência de tricomas em folhas e caules; cutícula estriada em ambas as superfícies, folha anfiestomática, estômatos anisocíticos, mesofilo dorsiventral e presença de laticíferos associados ao floema em caules e folhas;

b) Estudo Fitoquímico:

- a análise sistemática fitoquímica revelou a diversidade de metabólitos secundários presentes na espécie, como: esteroides, triterpenos; alcaloides; flavonoides e taninos;
- por procedimentos cromatográficos foi isolado e purificado da fração hexânica um hidrocarboneto identificado por RMN ^1H e ^{13}C como sendo *n*-tetracosano e uma mistura de esteroides composta por estigmasterol, sitosterol e campesterol;
- das subfrações L1 e L2 obtidas da fração diclorometano apresentaram perfil cromatográfico característico de alcaloides por CCD;
- da fração acetato de etila foram isolados e purificados por cromatografia em coluna um triterpeno puro e uma mistura de triterpenos, sendo eles, o ácido ursólico e ácido oleanoico, respectivamente. Além disso, por meio de CLAE foi possível identificar a presença do flavonoide diosmin.

c) Atividades Biológicas:

- a atividade antioxidante do extrato bruto e frações nos três métodos avaliados (fosfomolibdênio, DPPH e TBARS) não foi expressiva quando comparados aos padrões testados;
- o extrato bruto, a fração hexano e acetato de etila apresentaram uma moderada atividade antimicrobiana (entre 100-500 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. Para a levedura, *C. albicans*, a atividade das amostras testadas foi fraca ou ausente. Não foi observada atividade antimicrobiana para *P. aeruginosa* em nenhuma amostra testada. A

mistura de esteroides apresentou uma boa atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* e moderada para *E. coli*. O ácido ursólico revelou atividade moderada para *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. O tetracosano foi inativo para todas as amostras.

- Os extratos e frações não apresentaram toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, com valores de DL50 superiores a 1000 µg/mL.

Perspectivas futuras:

- Proceder investigação fitoquímica da fração hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica para tentar isolar outros constituintes químicos, uma vez que a espécie *L. exaltata* é um vegetal com abundante composição química e ainda restam muitos compostos a serem identificados e testados com relação as suas propriedades;
- Especificamente, realizar a extração de alcaloides visando o isolamento, purificação e elucidação de suas estruturas químicas, para posteriores testes farmacológicos.

REFERÊNCIA:

ADUONAI, I.; DU, M.; HANG, T. J. Identification and Determination of Related Substances in Diosmin Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations by HPLC and HPLC–MS. **Chromatographia**, v. 76, p 499-508, 2013.

AHMED, W.; AHMAD, Z.; MALIK, A. Stigmasteryl galactoside from *Rhynchosia minima*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4038-4039, 1992.

AHMED, Y. *et al.* Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii* **International Food Research Journal**, v.20, p 2939-2943, 2013.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids-Secrets of Life**: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Chapter 2. Alkaloid Chemistry. Finland, Elsevier, p. 65, 2007.

ANTONELLI, A. Higher level phyligeny and evolutionary trends in Campanulaceae subfam. Lobelioideae: Molecular signal overshadows morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**; v. 46, p 1-18, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v.23 N°2, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA): Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2008), Manual Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS). <www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em 08/2012.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**; v. 32, p 679-688, 2009.

BATISH, .D. *et al.* Chemical characterization and phytotoxicity of volatile essential oil from leaves of *Anisomeles indica* (Lamiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p 104–109, 2012.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; v. 1, 1976.

BELOTTI, V. *et al.* Frequency of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 137-140, 1999.

BERLIN, G. P., MIKSCH J. P. **Botanical microtechnique and pytochemistry**. Ames: Iowa State University, p. 121, 276, 1976.

BIAVATTI, M. W. Estudos sobre 8,10-di-n-propil-lobelidiol: Um novo alcaloide isolado de *Siphocampylus verticillatus* (CHAM.) G. DON., CAMPANULACEAE. Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Química, Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

BORIO, E. B. L. *Lobelia langeana* Dusén. Contribuição para o estudo farmacognóstico. Tese para concurso à docência livre da cadeira de farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Paraná. Brasil. 86p, 1959

BRAGA, R.E. Lobelias do Brasil. Contribuição para o seu estudo. **Tribuna Farmacêutica**; v 22, 1956.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente
<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=111>. Acesso em 31/05/2012.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V.C. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí, UNIVALI, 2003.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brasilian Journal of Medical and Biological Reserch**; v. 33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE MEDICAMENTOS. **Ciência e Cultura**; v.55, p 37-39, 2003.

CALIXTO J. B. e SIQUEIRA Jr. J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**; v 78, p. 98-106, 2008.

CARVALHO, J. L. C. Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**; v. 21, no. 1, 99, 1998.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR. **Química Nova**, v. 23, 2000.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.18, 785-797, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**; Fundação Calouste Gulbekian: Lisboa, v. II, 2a ed., 1977.

COSTA, D. A. *et al.* Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazonica**, v. 40, p. 207-212, 2010.

CRONQUIST (1968). **Sistemática de Angiospermas do Brasil, Classificação Segundo Cronquist**, v.2, 1984.

DHARMAPPA, K. K.*et al.* Anti-Inflammatory Activity of Oleanolic Acid by Inhibition of Secretory Phospholipase A2. **Planta Médica**, v. 75, p. 211-215, 2009.

DEL RIO J. A.*et al.* FUSTER, M. D.; GÓMEZ, P.; PORRAS, I., GARCÍA-LIDÓN, A.; ORTUÑO, A. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chemistry**, v.84, p.457-461, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: 2ª ed. John Wiley & Sons, Ltda, 2002.

ENGLER, A. Ebenaceae. In: **Syllabus Der Pflanzenfamilien**. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1964.

EYERMAN, D. J.; YAMAMOTO, B. K. Lobeline Attenuates Methamphetamine-Induced Changes in Vesicular Monoamine Transporter 2 Immunoreactivity and Monoamine Depletions in the Striatum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, p.160-169, 2005.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London, Academic Press. 302 p, 1979.

FARRELL, B. D.; DUSSOURD, D. E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: Do latex and resin canals spur plant diversification? **American Naturalist**,. v.138, p. 881-900, 1991.

FARMACOPEIA BRASILEIRA 2^a ed.; Ind. Gráfica Siqueira S.A.: São Paulo, 1959.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 3^a ed. Organização Andrei Editora S.A.: São Paulo, 1213p, 1977.

FARMACOPEIA BRASILEIRA . 5^a ed. Atheneu: São Paulo, Parte I, 2010.

FELPIN, F. X.; LEBETRON, J. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. **Tetrahedron**; v. 60, p. 10127-10153, 2004.

FLOREY, K. **Analytical Profiles of Drug Substances**. Academic Press: California, p. 261-314, 1990.

FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. 2. ed. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

GEETHALAKSHMI, R.; SARADA, D.V.L. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Trianthema decandra* L. **Journal of Pharmacy Research**, v.6, p.101 e106, 2013.

GODOY, S. A. P. Campanulaceae In WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD G.J.; GIULIETTI, A.M; MELHEM, T. S.; KIRIZAWA, M.. **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. v. 3. Editora Rima. FAPESP, 2003.

GOULART, M. O. F. *et al.* Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos triterpenos jatrofolonas A e B. **Química Nova**, v 16, 1993.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs, 2)**. New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955.

HARBONE, J.B., **Introduction to Ecological Biochemistry**. London: Academic Press, 278p., 1982.

HARROD, S. B.; DWOSKIN, L. P.; BARDO, M. T. Lobeline produces conditioned taste avoidance in rats. **Pharmacology Biochem Behav**; v. 78, p 1-5, 2004.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflanzen**; Birkhäuser Verlag: Basel; v. 4, 1966.

HOLETZ, F. B., *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

JIANG Y.*et al.* Studies on chemical components of *Lobelia chinensis*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v 34, p. 294-297, 2009.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York: McGraw Hill Book, p. 41, 1940.

JOSHI, S.*et al.* Essential oil composition and antimicrobial activity of *Lobelia pyramidalis* Wall. **EXCLI Journal**, v. 10, p. 274-279, 2011.

JUDD, W. S. *et al.* 2002. **Plant Systematics a phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Sunderland. 576 p, 2002.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil LTDA., 1993.

KUETE V. *et al.* Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v 124, p 556 - 561, 2009.

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, p. 101-112, 2012.

KUO, P. C.*et al.* Chemical constituents from *Lobelia chinensis* and their anti-virus and anti-inflammatory bioactivities. **Arch Pharm Res**, 34(5): 715-22, 2011.

LAMMERS T.G. **Campanulaceae Flowering Eudicot plants The families and Genera of Vascular Plants**, v. 8, p. 26-56, 2007.

LAMMERS T. G.. Revision of the Infrageneric Classification of LOBELIA L. (CAMPANULACEAE: LOBELIOIDEAE). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98, p. 37-62, 2011.

LEMES, G. F. L.; FERRI, P. H.; LOPES, M. N. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (LAMIACEAE). **Quim. Nova**, v. 34, p. 39-42, 2011.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p 57-68,1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MA, C. M.*et al.* The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p 582-589, 2005.

MA, Y.; WINK, M. Lobeline, a piperidine alkaloid from *Lobelia* can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. **Phytomedicine**, v. 15, p. 754-758, 2008.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MAGALHÃES, A. F. *et al.*. C₁₄ Polyacetylenes from Brazilian Lobelioideae. **Phytochemistry**, v. 27, 12, p. 3827-38301, 1988.

MAGALHÃES, A. F.; VIEIRA, D. M.; MAGALHÃES, E. G.; SHEPHERD, G. J. **Química Nova**, v. 12, p. 298, 1989.

MARANGONI, F; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, p 193–199, 2010.

MALLAVADHANI *et al.* Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. **Biol. Pharm. Bull.**, v 27, p. 1576—1579 2004.

MARTINDALE - **The Extra Pharmacopeia**; 29th ed.; Reynolds, J. E. F., Ed.; The Pharmaceutical Press: London, 1989.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N., *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL O. G.. **Desenvolvimento de fitoterápicos**, 2ª edição Editora Novo Conceito, p. 116, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v.26, n.3, p.211-219, 2004.

MOGHADASIAN, M.H. Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. **Life Sciences**, v. 67, p. 605-615, 2000.

MORAIS, S.M., *et al.* Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**. V. 47, p. 1-19, 1979.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests*. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, PA, 1993.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi*. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, p.28, 1998.

NAGANDA G. S., *et al.* Phytochemical screening and evaluation of antimicrobial activities of *in vitro* and *in vivo* grown plant extracts of *Lobelia inflata* L, 2001.

O'BRIEN T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

OLIVEIRA F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1991.

PARVIN , *et al.* Triterpenoids and phytosteroids from stem bark of *Crataeva nurvala* buch ham. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.01, p. 47-50, 2011.

PATIL, S. B.; RAJPUT, A. P. Chemical constituents from petroleum ether extract of leaves of *Butea monosperma* and their antimicrobial, antifungal activity. **International Journal of PharmTech Research**. v.4, p 321-326, 2012.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acid. **Free Radical Biology Medicine**, v. 20, p. 933-956.

ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos** 61: 33-36, 1972.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

ROSA, E. A. R. Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e moluscicida de *Palicourea rigida*. Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, 2009

SANTOS A. S. *et al.* Comunicado Técnico 99. **Descrição de Sistema de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 1^a. ed, 2004.

SARAIVA *et al.* 2012. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, 2012, p. 147-154.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, p. 97, 1951.

SHAI, L. J. Characterization of compounds from *Curtisia dentate* (Cornaceae) active against *Candida albicans*. Departament of Paraclinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, University of Pretoria, 2007.

SEN, *et al.* Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. **Science Secure Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 9-13, 2012.

SILVA, E. A. S. Estudos dos óleos essenciais extraídos de resinas de espécies *Protium spp.* São Carlos, 2006. Dissertação de Mestrado em Ciências (Química Analítica), Universidade de São Paulo.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a ed. Florianópolis: UFSC, 2010.

SONAGLIO, *et al.* Desenvolvimento tecnológico e produção e fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 289-386, 2010.

SUN, J.; WANG, X.; ZHANG, H. A new triterpenoid ester from *Lobelia sessilifolia*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.48, p. 416-8, 2012.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: Guia de campo**. Curitiba: Serzegrat, 419 p., 2001.

TAMBOLI, A. M. *et al.* Antiepileptic activity of lobeline isolated from the leaf of *Lobelia nicotianaefolia* and its effect on brain GABA level in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 537-542, 2012.

TESTA *et al.* Constituintes Químicos das folhas e avaliação da atividade antiinflamatória das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG. (RUBIACEAE). **Química. Nova**, v. 35, p. 527-529, 2012.

TOLEDO, A. C. O. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta, Bragança Paulista**; v. 21, p. 7-13, 2003.

TORRES-SANTOS E. C. *et al.* Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 114-120, 2004.

TRINTA, E. F.; SANTOS, E. **Flora Ilustrada Catarinense – Campanulaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 80p, 1989.

TSAI, S. J.; YIN, M. C. Antioxidative and Anti-Inflammatory Protection of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in PC12 Cells. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 174–178, 2008.

UDDIN, S. J.; GRICE, D.; TIRALONGO, G. Evaluation of cytotoxic activity of patriscabratine, tetracosane and various flavonoids isolated from the Bangladeshi medicinal plant *Acrostichum aureum*. *Pharmaceutical Biology*, v. 5, p. 1276-1280, 2012.

VALGAS, C. *et al.* Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 369-380, 2007.

VASCONCELOS, M. A. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursólico acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 61, p. 477-482, 2006.

VERPOORTE, R. In: **Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism**, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000.

VEIGA Junior, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**; vol. 28, no. 3, 519-528, 2005.

VEIGAS Jr. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Química Nova**; v.. 29, p. 326-337, 2006.
VIEIRA O. S. Estudos taxonômicos das espécies de *Lobelia* L. (Campanulaceae Juss.) que ocorrem no Brasil. Campinas, 1998. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal. Unicamp.

VIEIRA, O. S. Campanulaceae: *Lobelia* L.. In: Rafaela Campostrini Forzza *et al.* (Org.). Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsoon Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, v. 1, p. 833-835.

VIEIRA, A. O. S., GODOY, S. A. P. de 2012. *Campanulaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000073>>. Acesso em agosto de 2012.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae) **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 137-142, 2005.

WANG, *et al.* A novel effect of lobeline on vascular smooth muscle cell: inhibition of proliferation induced by endothelin-1. **Pharmazie**, v. 62, p. 620-624, 2007.

YU J, *et al.* Antioxidant Activit of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **Jounal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 2009-14, 2005.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CHECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**; vol. 24, no. 1, 147-152, 2001.

YUNES, R. A.; CHECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia**, 3ª edição. Editora Univali, p. 384, 2012.

ZANG L.; WU B.; LIN Y.; WANG J.; FU L.; TANG Z. Research Progress of Ursolic Acid's Anti-Tumor Actions. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v.20, p.72-79, 2014.

ZANGH, M. Z.; WANG, J. C.; ZHOU, S. H. Alkaloids and triterpenoids of *Lobelia davidii*. **Phytochemistry**; v. 29, p. 1353-1354, 1990.

ZHOU Y, *et al.* Two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry for the analysis of *Lobelia chinensis* Lour. Using an ESI/APCI multimode ion source. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2339–2518, 2008.